# ZUR ELEKTRONENSTOSSINDUZIERTEN DEHYDRATISIERUNG VON HYDROXYSTEROIDEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manfred Ende
aus Hovestadt/Soest

Göttingen 1974

# ZUR ELEKTRONENSTOSSINDUZIERTEN DEHYDRATISIERUNG VON HYDROXYSTEROIDEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manfred Ende
aus Hovestadt/Soest

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent : Professor Dr. G. Spiteller

Korreferent : Professor Dr. W. Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung : 3. 7. 1974

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mir von Oktober 1971 bis Dezember 1973 ein Dissertationsstipendium gewährte, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. G. Remberg danke ich für die Bestimmungen der Bruttoformeln mit der Hochauflösungstechnik, Herrn Dr. Rapp, von der Firma Varian - MAT, Bremen, für die Aufnahme der DADI-Spektren.
Besonders danke ich Frau von Cotzhausen, die mit großer Sorgfalt das Manuskript schrieb.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0062

INHALTSVERZEICHNIS

A EINLEITUNG 1

B THEORETISCHER TEIL 5

I Überlegungen zu Mechanismen der Wasser-eliminierung an Dreiding-Modellen 5

1. Mechanismen der massenspektrometrischen $H_2O$-Eliminierung 6

a) 1,4-$H_2O$-Eliminierung aus der Wannenform des Sechsringes 8

b) 1,3-diaxiale-cis-Eliminierung 9

c) 1,4-Eliminierung aus einem cyclischen Übergangszustand 10

2. Systematische Modellbetrachtungen 11

3. Überlegungen zur Wasserelimination bei Hydroxysteroiden 16

4. Zusammenhänge zwischen Dehydratisierungstendenz und Eliminierungsmechanismus 18

5. Diskussion der Ergebnisse 21

II Massenspektrometrische Fragmentierung von 3-Hydroxysteroiden 28

1. Dehydratisierungsverhalten von 3-Hydroxysteroiden 28

2. Konfigurationsbedingte Bruchstückbildung von 3$\alpha$-Hydroxysteroiden mit cis-Verknüpfung des A/B-Ringsystems 31

3. Mechanistische Überlegungen zur Wasser- und Butadienabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden mit einer Ketogruppe in Position 11 36

4. Mechanistische Deutung der Wasser- und Äthylenabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden 41

III Synthese der deuterierten Verbindungen 43

1. Berechnung des Deuterierungsgrades aus dem Isotopenmuster der Molekülionen 43

2. Synthese der deuterierten Verbindungen 46

a) Synthese von 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) 47

b) Synthese von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) und 2,2,4,4-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19) 52

3. Synthese der deuterierten Verbindungen zur mechanistischen Untersuchung der Wasser- und Äthylenabspaltung 55

a) Synthese von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) 55

b) Deuterierung der Doppelbindung in 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) 57

IV Diskussion der Massenspektren 60

1. Allgemeines 60

2. Diskussion der Spektren zur Untersuchung des Mechanismus der Wasser- und Butadienabspaltung 62

3. Diskussion der Spektren zur Untersuchung des Mechanismus der Wasser- und Äthylenabspaltung 70

C ZUSAMMENFASSUNG 77

D EXPERIMENTELLER TEIL 82

1. Allgemeines 82

a) Aufnahme der Massenspektren 82

b) Messung der DADI-Spektren 82

c) Präparative Dünnchichtchromatographie 83

2. Beschreibung der Versuche 83

a) Synthese von 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) 83

b) Allgemeine Vorschrift für den säurekatalysierten Austausch von enolisierbaren H-Atomen gegen Deuterium 85

c) Versuche zur partiellen Reduktion der 3-Ketogruppe in Androstan-3,11,17-trionen 86

d) Synthese von 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) 89

e) Darstellung von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) und 2,2,4,4-$d_4$-3$\alpha$-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19) 90

f) Darstellung von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) 92

g) Deuterierung von 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) 96

LITERATURVERZEICHNIS 97

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND SCHEMATA


| | | | Seite |
|---|---|---|---|
| Tabelle | 1 : | Aus Modellbetrachtungen ableitbare $H_2O$-Eliminierungsmechanismen von Monohydroxysteroiden | 14 |
| | 2 : | Zusammenfassung der mit Hilfe von Modellüberlegungen möglichen Aussagen über die Dehydratisierungstendenz von Monohydroxysteroiden | 20 |
| | 3 : | Berechnung des Deuterierungsgrades | 45 |
| Schema | 1 : | Massenspektrometrische Dehydratisierung und nachfolgende Methylradikalabspaltung aus 12α,17ß-Dihydroxysteroiden | 27 |
| | 2 : | Mechanismus der Wasser- und Butadienabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden mit einer Carbonylgruppe in Position 11 | 39 |
| | 3 : | Mechanismus I der Wasser-und Äthylenabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden | 41 |
| | 4 : | Mechanismus II der Wasser- und Äthylenabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden | 42 |
| | 5 : | Synthese von 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) | 48 |
| | 6 : | Synthese von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) | 56 |

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN


Seite

Abbild. 1 : a). Zählweise am tetracyclischen Ringsystem der Steroide 12

b) Konfiguration bei A/B-trans-Verknüpfung 12

13 : Strukturelement : Nur Androstane dieser Konfiguration und Substitutionsart spalten massenspektrometrisch $H_2O$ und $C_2H_4$ ab. 35


Abgebildete Massenspektren :


Abbild. 3 : 3α,17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-on 29

4 : 3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-on 29

5 : 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on 30

6 : 3ß,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on 30

7 : 3α,11α,17ß-Trihydroxy-5ß-androstan 32

8 : 3α,11ß,17ß-Trihydroxy-5ß-androstan 32

9 : 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan 33

10 : 3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on 33

11 : 3α,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-on 34

12 : 3α,20α-Dihydroxy-5ß-pregnan 34

14 : 9α,12α-$d_2$-3α,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-on 37

15 : 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) 63

16 : 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) 63

20 : 2,2,4,4-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19) 68

21 : 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) 68

22 : 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (16) 69

Seite

Abbild. 23 : 9α,11,X-$d_3$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (24) 72

26 : 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) 75

Abgebildete DADI-Spektren :

Abbild. 17 : Molekülion von 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) 64

18 : Molekülion von 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (11) 65

19 : M-18 Ion von 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (11) 66

24 : Molekülion von 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (20)

25 : M-18 Ion von 3α-17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (20) 73

## A EINLEITUNG

Die durch Säure oder Base katalysierte Wasserabspaltung ist eine 1,2-Eliminierungsreaktion. Im Massenspektrometer werden Alkohole durch Elektronenstoß dehydratisiert. Deuterierungsversuche ergaben, daß bei geradkettigen aliphatischen Alkoholen mit der Hydroxylgruppe zu 90% Wasserstoffatome aus der Position 4 eliminiert werden [1].

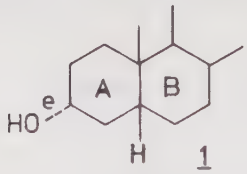
Natalis [2] zeigte an entsprechend deuterierten Cyclohexanolen, daß auch in cyclischen Hydroxyverbindungen die massenspektrometrische Wasserabspaltung keine 1,2-Eliminierung ist. Weitere Untersuchungen bestätigen, daß bei der Wasserelimination aus Cyclohexanolen eine 1,3- sowie eine 1,4-Eliminierung erfolgt [3,4]. Shannon [3] konnte überdies zeigen, daß an dieser Eliminierungsreaktion die in den Positionen 3 bzw. 4 zur Hydroxylgruppe am C-Atom 1 cis-ständigen Wasserstoffatome beteiligt sind.

Biemann [5] erkannte zuerst, daß sich epimere cyclische Alkohole deutlich in den Massenspektren unterscheiden : Im Massenspektrum des weniger "kompakten" Epimeren (äquatoriale Hydroxylgruppe) ist die Molekülionenintensität im Vergleich zur Intensität der $M-H_2O$ Ionen höher als im Massenspektrum des epimeren Alkohols mit axialer Hydroxylgruppe.

Später zogen Zaretskii und Mitarb. [6] aus den Massenspektren von 11-Hydroxysteroiden den allgemeinen Schluß, daß in Monohydroxysteroiden mit axialer Hydroxylgruppe der Quotient aus der Intensität der Molekülionen und der Intensität der M-18 Ionen einen Wert unter 1 hat ($M^+/M-18 < 1$), und daß bei Monohydroxysteroiden mit äquatorialer Hydroxygruppe dieser Quotient größer als 1 ist ($M^+/M-18 > 1$).

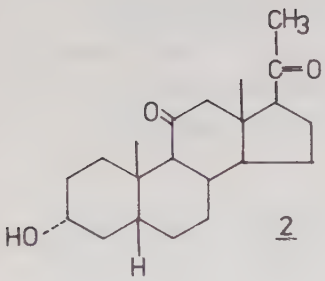
Diese Aussage wurde durch die Arbeit von Egger und Spiteller [7] teilweise widerlegt : Untersuchungen an 3-Hydroxysteroiden ergaben, daß die Wasserelimination vorzugsweise von der Verknüpfungsart des A/B-Ringsystems abhängig ist.
Die Intensität der M-18-Spitzen ist besonders hoch in den Massenspektren der äquatorialen Hydroxysteroide mit 5ß-H-Konfiguration. Die Konfiguration der Hydroxylgruppe in Position 3 des Steroidgerüstes kann bei trans-Verknüpfung des A/B-Ringsystems n i c h t an den Intensitätsunterschieden der Molekülionen bzw. der M-18 Ionen erkannt werden.

Bei der vergleichenden Untersuchung der Massenspektren von Pregnanderivaten mit Sauerstoffsubstituenten in den Positionen 3, 11 und 20 während meiner Diplomarbeit zeigten sich ebenfalls immer dann M-18 Spitzen mit auffallend hoher Intensität, wenn das Strukturelement 1 im Steroidmolekül vorhanden war [8, 9, 10].

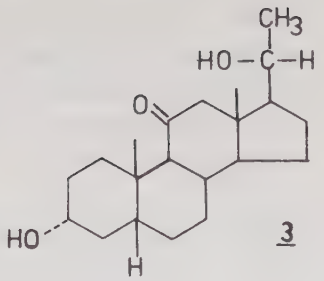



1

In den Massenspektren von 3α-Hydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion [9] (2) und 3α,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-on (3) [8] finden sich überdies noch zusätzlich Schlüsselionen, die in einem Folgeprozeß durch Abspaltung von Butadien aus dem M-18 Fragment gebildet werden.




2




3

Auf Grund dieser Bruchstückbildung, die meistens ein Hauptspaltungsprozeß im Massenspektrometer ist, kann bei vielen Steroiden die Verknüpfungsart des A/B-Ringsystems und die Konfiguration der 3-Hydroxygruppe eindeutig aus dem Massenspektrum abgeleitet werden. Wegen der großen Bedeutung dieser Reaktion für die Strukturbestimmung von Steroiden mit Hilfe der Massenspektrometrie, wurde der Mechanismus in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht.

## Problemstellung

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Beobachtung gemacht, daß OH-Gruppen an Steroiden je nach ihrer Konfiguration unterschiedliche Tendenz zur $H_2O$-Eliminierung im Massenspektrometer zeigen [9-11]. Die aus der Literatur bekannten Untersuchungen ließen überdies erwarten, daß es zumindest in einigen Fällen möglich sein sollte, allein aus dem Massenspektrum stereochemische Aussagen über die Konfiguration der Hydroxylgruppe am Steroidskelett machen zu können.

Gerade bei Hydroxysteroiden wäre es wertvoll, Zusammenhänge zwischen dem massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten und der Konfiguration zu finden, weil hier die anderen physikalischen Methoden nur wenig Information liefern. Die Massenspektrometrie hat zudem den Vorteil, nur geringe Substanzmengen zu benötigen.

Um festzustellen nach welchen Mechanismen die $H_2O$-Abspaltungen in der Ionenquelle des Massenspektrometers theoretisch möglich sind, führte ich zunächst Modellbetrachtungen (Dreiding-Modelle) durch, bei denen ich die bisher bekannten massenspektrometrischen Eliminierungsmechanismen zugrunde legte. Die Voraussagen der Modellüberlegungen überprüfte ich an Spektren der von uns zusammengestellten Steroidmassenspektren kartei [12] und an Literaturspektren.

An einem uns besonders wichtig erscheinenden Beispiel, nämlich bei 3$\alpha$-Hydroxysteroiden mit cis-Verknüpfung des A/B-Ringsystems, postulierte ich Mechanismen für die $H_2O$-Eliminierung und die nachfolgende Butadien-bzw. Äthylenabspaltung. Anschließend markierte ich die entsprechenden Hydroxysteroide gezielt mit Deuterium, um die aufgestellten Fragmentierungsmechanismen mit Hilfe der Massenspektren der deuterierten Verbindungen experimentell zu bestätigen.

## B THEORETISCHER TEIL

### I Überlegungen zu Mechanismen der Wassereliminierung an Dreiding-Modellen

Dreiding-Modellbetrachtungen von Monohydroxysteroiden wurden mit dem Ziel vorgenommen, mögliche Mechanismen der massenspektrometrischen Wassereliminierung abzuleiten und die Tendenz bzw. unterschiedliche Tendenz der $H_2O$-Eliminierung — bedingt durch die Konfiguration der Hydroxylgruppe — vorauszusagen. Die von Dreiding entworfenen Modelle sind auf 0,2 mm genau gearbeitet und können verwendet werden, um Abstände zwischen nicht direkt miteinander verbundenen Atomen zu messen. Dabei entspricht 1 cm des Modells einem Abstand von 0,4 Å im Molekül. Die geringfügigen Änderungen in der Bindungslänge, die sich beim Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium ergeben [13], liegen innerhalb der an Dreiding-Modellen möglichen Meßgenauigkeit.

Bereits von verschiedenen Autoren wurde experimentell bestätigt, daß Modellbetrachtungen auch zur Diskussion massenspektrometrischer Reaktionen herangezogen werden können [14,15].

Fenselau und Robinson [14] ermittelten, bei welchem räumlichen Mindestabstand der Wasserstoffatome zur Hydroxylgruppe eine Abspaltung von $H_2O$ überhaupt möglich ist. Bei der elektronenstoßinduzierten Wassereliminierung werden nicht nur Wasserstoffatome, die an Kohlenstoff gebunden sind mit der OH-Gruppe eliminiert, sondern auch an Sauerstoff gebundene H-Atome von Hydroxylgruppen. Die Hydroxylsauerstoffatome lassen sich außerdem direkt im Einlaßsystem des Massenspektrometers gegen Deuterium aus-

tauschen. Die Autoren verwendeten deswegen für ihre Untersuchungen Dihydroxysteroide, die sie durch Zugabe von Monodeuteromethanol zu der zu messenden Probe direkt im Massenspektrometer deuterierten. Das erste Auftreten einer $D_2O$-Abspaltung registrierten sie bei der Aufnahme des Massenspektrums von Dideutero-16$\alpha$,17ß-dihydroxy-4-androsten-3-on. Der O-H--OH-Abstand in diesem Molekül, ermittelt an Dreiding-Modellen, beträgt 3,2 Å. Eindeutiger und intensiver war die $D_2O$-Abspaltung jedoch erst in solchen Dideutero-dihydroxysteroiden, in denen der O-H--OH-Abstand zwischen 1,6 und 2,3 Å liegt.

Andererseits konnten Mac Leod und Mitarb. [15] zeigen, daß im endo-3-Bicyclo[3.3.1]nonanol, wo der ebenfalls aus Dreiding-Modellen ableitbare Abstand des endo-H-Atoms in Position 7 zur Hydroxylgruppe nur 0,6 Å beträgt, keine Eliminierung des 7-endo-H-Atoms mit der Hydroxylgruppe am C-Atom 3 stattfindet.

Aus diesen Untersuchungen folgt : Eine stereospezifische Eliminierung der OH-Gruppe mit einem räumlich benachbarten H-Atom ist nur in einem begrenzten H--OH-Abstandsbereich möglich. Dieser Bereich liegt etwa zwischen 1 und 2,5 Å.

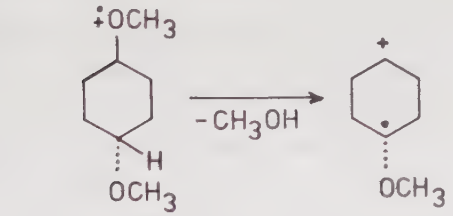
## 1. Mechanismen der massenspektrometrischen $H_2O$-Eliminierung

Die Dehydratisierung von cyclischen Alkoholen in der Ionenquelle des Massenspektrometers kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen :

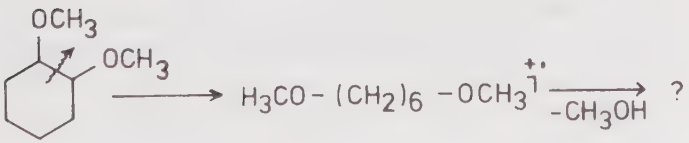
1) Die Wasserelimination erfolgt vor einem C-C-Bindungsbruch zwischen Kohlenstoffatomen des Ringskeletts durch räumliche Annäherung eines H-Atomes an die Hydroxylgruppe. Nur in

diesem Fall (wenn die OH-Gruppe in einem genügend festen Ringsystem eingebaut ist) ist die Dehydratisierung sterisch kontrolliert. Die Größe des stereochemischen Effektes wird von der Stabilität der cyclischen Molekül-Ionen beeinflußt [16,17].

2) Die $H_2O$-Abspaltung aus dem Molekül-Ionen erfolgt nach dem Bruch von C-C-Ringbindungen. Die Ringspaltung wird durch zusätzliche, vornehmlich vicinale Substituenten, energetisch begünstigt :
Grützmacher[16] konnte bei der massenspektrometrischen Untersuchung von substituierten Methoxycyclohexanen zeigen, daß die konfigurationsbedingten Unterschiede in der $CH_3OH$-Abspaltung durch Methylsubstituenten benachbart zur Methoxygruppe vermindert und durch vicinale Methoxysubstituenten sogar aufgehoben werden.



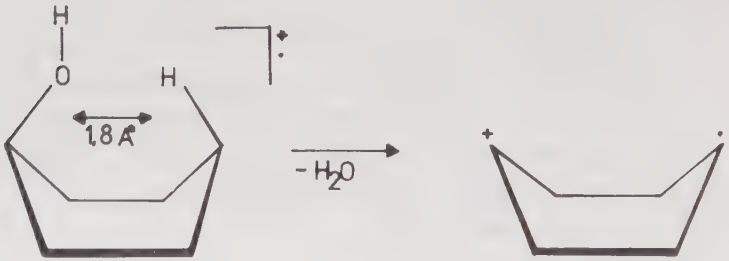

stereospezifische $CH_3OH$-Eliminierung




unspezifische $CH_3OH$-Eliminierung

a) 1,4-$H_2O$-Eliminierung aus der Wannenform des Sechsringes [16,18-21]

Steht eine äquatoriale (axiale)OH-Gruppe in einem Sechsring einem axial- (äquatorial-) konfigurierten H-Atom am C-Atom 4 des Ringes gegenüber, so kann eine für die $H_2O$-Eliminierung erforderliche Annäherung des H-Atoms an die OH-Gruppe in der Wannenform des Sechsringes erfolgen :

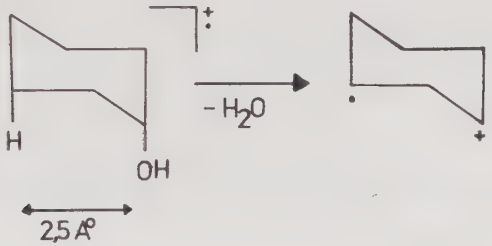



Der Abstand zwischen O- und H-Atom beträgt bei dieser Annäherung 1,8 Å.

Ein Beweis für die $H_2O$-Abspaltung aus der Wannenform ist die Tatsache, daß die Intensität der M-HOD-Ionen im Massenspektrum von trans-1,4-Dideuterocyclohexan-1,4-diol achtmal höher ist als im Massenspektrum von cis-1,4-Dideuterocyclohexan-1,4-diol [17]. Weil nur die Ringe A und B ungehindert in die Wannenform umklappen können, hat dieser Mechanismus nur Bedeutung bei Hydroxysteroiden, die die Hydroxylgruppe im A- oder B-Ring tragen.

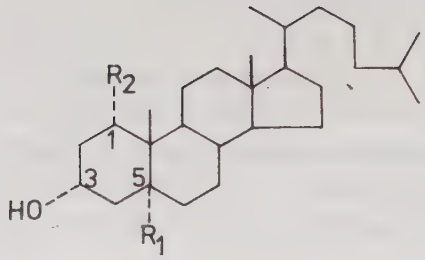
b) 1,3-diaxiale-cis-Eliminierung

Im Vergleich zum 1,4-Eliminierungsmechanismus ist der Abstand vom O- zum H-Atom hier größer, er beträgt 2,5 Å. Eine $H_2O$-Eliminierung unter Beteiligung des H-Atoms aus Position 3 (gezählt vom C-Atom, das die OH-Gruppe trägt) konnte jedoch ebenfalls durch die Aufnahme von Massenspektren deuterierter Cyclohexanole bewiesen werden [18,20].




Diese Eliminierung verläuft energetisch nicht so günstig wie die 1,4-Eliminierung. Im Cyclohexanol beträgt das Verhältnis von 1,3- zu 1,4-Eliminierung 0,7:1 [18] bzw. 0,5:1 [19], obwohl die statistische Wahrscheinlichkeit für die 1,3-Eliminierung doppelt so hoch ist.

Auch im 3α-Hydroxy-5α-cholestanol (4) wird $H_2O$ in einer 1,3-Eliminierung abgespalten [22]. In den M-34 ($CH^{\bullet}_3$ + HOD)-Fragmenten der entsprechend deuterierten Verbindungen wurden 73% Deuterium aus der 5α-Position und 5% aus der 1α-Position abstrahiert. Im 3α-Hydroxy-5α-cholestanol wird erst nach der Abspaltung eines Methylradikals Wasser eliminiert. Wegen des Fehlens von M-HOD und M-$H_2O$ Ionen in den Spektren von 4a und 4b, müssen stattdessen die relativen Intensitäten der M-($CH^{\bullet}_3$ + HOD) Ionen miteinander verglichen werden.



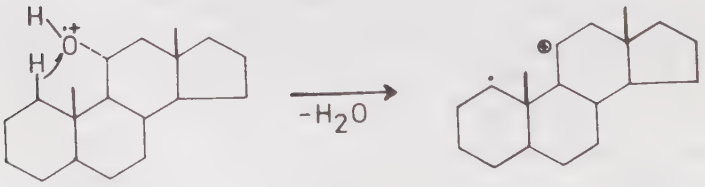

4 : $R_1$ = H; $R_2$ = H

4a : $R_1$ = D; $R_2$ = H

4b : $R_1$ = H; $R_2$ = D

c) 1,4-Eliminierung aus einem cyclischen Übergangszustand

Im tetracyclischen Steroidgerüst sollte neben den an Sechsringen beschriebenen 1,3- und 1,4-Eliminierungen, die Wasserstoffatome des gleichen Ringes erfassen, noch solche möglich sein, die unter Beteiligung von H-Atomen aus benachbarten Ringen erfolgen. Ein Beispiel hierfür sind 11$\alpha$-Hydroxysteroide, in denen der Abstand der Hydroxylgruppe zum äquatorialen H-Atom an C 1 weniger als 2 Å beträgt. In diesem Falle ist eine 1,4-Eliminierung über einen sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustand möglich :



Fehlhaber [23] konnte nachweisen, daß über 50% der M-$H_2O$-Ionen in A/B-cis-verknüpften 11$\alpha$-Hydroxysteroiden mit einer zusätzlichen Carbonyl- oder Hydroxylfunktion in Position 3 auf diesem Wege gebildet werden.

Bei den Modellüberlegungen prüfte ich daher, ob neben den bisher beschriebenen Eliminierungsmöglichkeiten noch andere H-Atome einen für die Dehydratisierung günstigen Abstand zur Hydroxylgruppe einnehmen können.

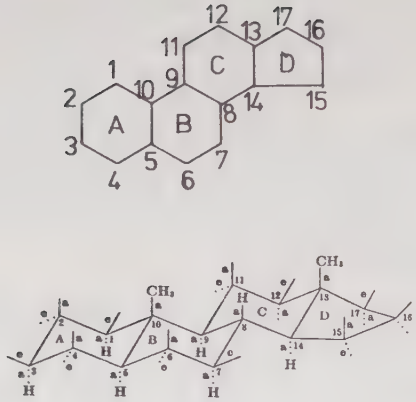
Eine 1,2-$H_2O$-Eliminierung kann bei Steroiden ausgeschlossen werden [24]. Die bisher einzige massenspektrometrische cis-1,2-Eliminierung von Wasser wurde von Seibl [25] beschrieben. Er untersuchte die $H_2O$- und $CH_3COOH$-Abspaltung aus dem epimeren Bornylalkoholen.

## 2. Systematische Modellbetrachtungen

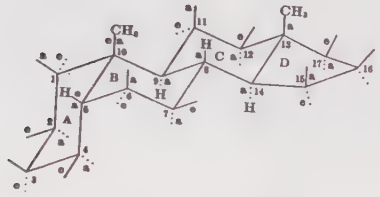
Für Monohydroxysteroide mit Hydroxylfunktionen in den Positionen 1 bis 7 sowie 11 und 12 wurde mit Hilfe von Dreiding-Modellen geprüft, welche Eliminierungsmechanismen bei welcher Konfiguration der Hydroxylgruppe möglich sind. Dabei wurden folgende Konformationen des Steroidgerüstes berücksichtigt :

1) Sesselform sämtlicher Sechsringe
2) Wannenform des A-Ringes
3) Wannenform des B-Ringes
4) Wannenform der Ringe A und B

Die Abbildungen 1 und 2 geben einerseits eine Übersicht über die Zählweise am tetracyclischen Steroidskelett und andererseits einen Einblick in die sterische Anordnung der Substituenten sowie der Ringe bei A/B-trans- und A/B-cis-Verknüpfung.




Abbild. 1 : a) Zählweise am tetracyclischen Ringsystem der Steroide
b) Konfiguration bei A/B-trans-Verknüpfung (5α-H-Konfiguration).




Abbild. 2 : Konfiguration von Steroiden mit A/B-cis-Verknüpfung (5ß-H-Konfiguration).

In Tabelle 1 sind sämtliche aus den Molekülmodellen ableitbaren Eliminierungsmöglichkeiten der betrachteten Monohydroxysteroide zusammengefaßt. In den beiden ersten Spalten ist die Position und

Konfiguration der Hydroxylgruppe sowie die Verknüpfungsart des A/B-Ringsystems angegeben. In der Spalte 3 wurden diejenigen Wasserstoffatome aufgeführt, deren Abstand zur Hydroxylgruppe in den jeweils betrachteten Konformationen der Ringe A und B (angegeben in Spalte 5 und 6) höchstens 2,5 Å beträgt. Die Abstände wurden an Dreiding-Modellen auf $\pm$ 1 mm genau gemessen und nach der Umrechnung mit Hilfe des zugrundeliegenden Maßstabes (1 cm entspricht 0,4 Å) auf 0,1 Å auf- bzw. abgerundet angegeben. In der letzten Spalte ist der Mechanismus aufgeführt, nach dem die $H_2O$-Eliminierung unter Beteiligung des betrachteten Wasserstoffatoms ablaufen könnte Dabei wurden folgende Abkürzungen verwendet :

1) Wannenform-1,4-EM = 1,4-$H_2O$-Eliminierung aus der Wannenform des Sechsringes

2) 1,3-diax. EM = 1,3-diaxiale-cis-Eliminierung

3) cyclo.-1,4-EM = 1,4-Eliminierung aus einem cyclischen Übergangszustand

Tab. 1 : Aus Modellbetrachtungen ableitbare $H_2O$-Eliminierungsmechanismen von Monohydroxysteroiden

| Position und Konfig. der OH-Gruppe | A/B-Ring-Verknüpfg. | An der Eliminierung beteiligte H-Atome | H-OH-Abstd. in Å | Konform. des A-Ringes | Konform. des B-Ringes | Eliminierungsmechanismus |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1α (a) | trans | 3α-H, 5α-H, 9α-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 1β (e) | trans | 11α-H | 1,8 | Sesself. | Sesself. | cycl.-1,4-EM |
| | | 3β-H | 2,5 | Wannenf. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| | | 11α-H | 1,8 | Sesself. | Sesself. | cycl.-1,4-EM |
| 1α (e) | cis | 6α-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | cycl.-1,4-EM |
| | | 3α-H | 2,5 | Wannenf. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 1β (a) | cis | 3β-H, 5β-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| | | 4β-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | Wannenf.-1,4-EM |
| 2α (e) | trans | 5α-H | 1,8 | Wannenf. | Sesself. | Wannenf.-1,4-EM |
| 2β (a) | trans | 4β-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 2α (a) | cis | 4α-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| | | 9α-H | 1,8 | Sesself. | Sesself. | cycl.-1,4-EM |
| | | 6α-H | $\ll 1$ | Wannenf. | Wannenf. | sehr günstige Annäherung +) |
| 2β (e) | cis | 5β-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | Wannenf.-1,4-EM |
| | | 4β-H | 2,5 | Wannenf. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 3α (a) | trans | 1α-H, 5α-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 3β (e) | trans | ---- | | | | ---- |
| 3α (e) | cis | 9α-H | 1 | Wannenf. | Sesself. | sehr günstige Annäherung |
| | | 1α-H | 2,5 | Wannenf. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| | | 6α-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | cycl.-1,4-EM |
| 3β (a) | cis | 1β-H, 5β-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 4α (e) | trans | 6α-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-EM nicht diaxial |
| 4β (a) | trans | 2β-H, 6β-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| 4α (a) | cis | 2α-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| | | 6β-H | 2,5 | Wannenf. | Wannenf. | 1,3-diax. EM |
| | | 7α-H | 1,8 | Sesself. | Sesself. | cycl.-1,4-EM |
| | | 9α-H | 1,8 | Wannenf. | Sesself. | cycl.-1,4-EM |
| 4β (e) | cis | 1β-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | Wannenf.-1,4-EM |
| | | 2β-H | 2,5 | Wannenf. | Sesself. | 1,3-diax. EM |
| | | 6α-H | 2,5 | Sesself. | Sesself. | 1,3-EM nicht diaxial |

+) Dieser günstige Abstand von OH-Gruppe zu H-Atom ist nur im Modell konstruierbar. Das Molekül nimmt diese Konformation wegen der hohen zur Annäherung notwendigen Energie nicht ein.

Tab. 1 : Fortsetzung

| Position und Konfig. der OH-Gruppe | A/B-Ring-Verknüpfg. | An der Eliminierung beteiligte H-Atome | H···OH-Abstd. in Å | Konform. des A-Ringes | Konform. des B-Ringes | Eliminierungsmechanismus |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5α | trans | 1α-H, 3α-H, 7α-H, 9α-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| | | 2α-H | 1,8 | Wannenf. | Sessel. | Wannenf.-1,4-EM |
| 5β | cis | 1β-H, 3β-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| | | 2β-H | 1,8 | Wannenf. | Sessel. | Wannenf.-1,4-EM |
| | | 8β-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | Wannenf.-1,4-EM |
| 6α (e) | trans | 9α-H | 2,4 | Sessel. | Wannenf. | Wannenf.-1,4-EM |
| | | 4α-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-EM nicht diaxial |
| 6β (a) | trans | 4β-H, 8β-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| 6α (e) | cis | 1α-H, 3α-H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | cycl.-1,4-EM |
| | | 4β-H | 2,4 | Sessel. | Sessel. | 1,3-EM nicht diaxial |
| | | 9 -H | 1,8 | Wannenf. | Wannenf. | Wannenf.-1,4-EM |
| 6β (a) | cis | 8β-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| 7α (a) | trans | 5α-H, 9α-H, 14α-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| 7β (e) | trans | ---- | | | | ---- |
| 7α (a) | cis | 4α-H | 1,8 | Sessel. | Sessel. | cycl.-1,4-EM |
| | | 9α-H, 14α-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| 7β (e) | cis | 5β-H | 2,5 | Wannenf. | Wannenf. | 1,3-diax. EM |
| 11α (e) | ---- | 1β-H (A/B-trans) 1α-H (A/B-cis) | 1,8 | Sessel. | Sessel. | cycl.-1,4-EM |
| 11β (a) | ---- | 8β-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| 12α (a) | ---- | 9α-H, 14α-H | 2,5 | Sessel. | Sessel. | 1,3-diax. EM |
| | | 17α-H | 2,6 | Sessel. | Sessel. | quasi 1,3-diax. EM |
| 12β (e) | ---- | 20-H in Pregnanen | 2,6 | Sessel. | Sessel. | ---- |

## 3. Überlegungen zur Wasserelimination bei Hydroxysteroiden

Bei theoretischen Überlegungen zur Dehydratisierung von Hydroxysteroiden müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden :

### 1) Spaltung von C-C-Ringbindungen vor der Wasserabspaltung

Die in der Tabelle zusammengefaßten Ergebnisse berücksichtigen nur solche Wasserelimination, die durch günstige räumliche Annäherung von Wasserstoffatomen an die Hydroxylgruppe in den intakten Ringsystemen ablaufen können. Es muß aber immer davon ausgegangen werden, daß im Molekülion auch schon vor der Dehydratisierung ein Ringbindungsbruch eintreten kann. Durch die freie Drehbarkeit der so entstandenen Kohlenstoffkette werden nun weitere, unspezifische $H_2O$-Eliminierungen möglich. Ringbindungsbrüche vor der Dehydratisierung sind umso wahrscheinlicher, je geringer die Stabilität des Kohlenstoffringes ist. Die Ringstabilität ist bei gegebener Ringgröße in erster Linie von der Substitutionsart abhängig ; die C-C-Bindung zwischen vicinalen Substituenten ist besonders labil.

In Molekülionen von Hydroxysteroiden, in denen sich die Hydroxylgruppe benachbart zu einer Ringverknüpfungsstelle befindet, wird vor massenspektrometrischer Eliminierungsreaktion in hohem Maße zunächst ein Ringbindungsbruch zwischen Verknüpfungsstelle und OH-Gruppe tragendem C-Atom stattfinden. In diesen Fällen können aus dem Massenspektrum keine stereochemischen Aussagen abgeleitet werden.

2) Unterschiedliche C-H-Bindungsenergien

Die Dissoziationsenergie der C-H-Bindung ist abhängig vom Substitutionsgrad des Kohlenstoffatoms, von dem die Bindung ausgeht. Sie ist umso geringer, je höher der Substitutionsgrad ist. Die von den tertiären C-Atomen 5, 8, 9 und 14 ausgehenden C-H-Bindungen haben eine geringere Dissoziationsenergie als die übrigen C-H-Bindungen im Steroidgerüst. Deswegen ist zu vermuten, daß die Wasserstoffatome aus diesen Positionen besonders leicht abgespalten und auf eine Hydroxylgruppe übertragen werden. In der Tabelle sind diese H-Atome daher durch Unterstreichen besonders gekennzeichnet.

Auch durch eine OH-Gruppe wird die am gleichen Kohlenstoffatom befindliche C-H-Bindung stark gelockert [16]. Wenn in Hydroxysteroiden eine zusätzliche Ketogruppe vorhanden ist, so muß berücksichtigt werden, daß die H-Atome an benachbarten C-Atomen "aktiviert" sind.

Eine weitere funktionelle Gruppe im Steroidgerüst übt einen entscheidenden Einfluß auf die massenspektrometrische Bruchstückbildung aus, der meistens nicht aus dem Spaltungsverhalten der einzelnen monofunktionellen Verbindungen abgeleitet werden kann. Deswegen wird es kaum möglich sein, mechanistische Überlegungen an Modellen bifunktioneller Hydroxysteroide durchzuführen. Jedoch können einfache Abhängigkeiten, wie die Herabsetzung der C-H-Bindungsenergie an Carbinol-C-Atomen und an C-Atomen neben einer Carbonylfunktion berücksichtigt werden.

3) Folgereaktionen mit günstiger Energiebilanz

Wenn im Massenspektrometer eine intensive Wasserabspaltung beobachtet wird, obwohl die ableitbaren räumlichen Annäherungen von H-Atomen nicht sehr günstig erscheinen, so ist das in vielen Fällen damit zu erklären, daß in einem nachfolgenden Spaltungsvorgang ein energetisch stabiles Bruchstück gebildet wird. Die gesamte Reaktion wird also von einem Folgeprozeß mit günstigem Energieprofil "gezogen". Ein Beispiel hierfür sind 12 $\alpha$, 17ß-Dihydroxysteroide, deren Dehydratisierungsverhalten im Abschnitt I, 5 diskutiert wird.

## 4. Zusammenhänge zwischen Dehydratisierungstendenz und Eliminierungsmechanismus

Beim Vergleich der aus den Modellbetrachtungen gewonnenen Aussagen mit experimentellen Ergebnissen, die aus den Massenspektren von Hydroxysteroiden unserer Steroidmassenspektrenkartei [12] und aus der Literatur abzuleiten sind, ergab sich eine einfache Abhängigkeit der Wassereliminierungstendenz von der Art des postulierten Mechanismus.

Die M-$H_2O$-Ionen sind besonders hoch in den Massenspektren von Hydroxysteroiden, bei denen eine 1,4-Eliminierung aus der Wannenform des Sechsringes oder über einen sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustand angenommen werden kann. Besteht nur die Möglichkeit einer 1,3-diaxialen-cis-Eliminierung, so ist die Dehydratisierungstendenz wesentlich geringer. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Untersuchungen von Shannon [18] und Djerassi [19] an Cyclohexanolen.

Die Dehydratisierungstendenz bei der 1,3-Eliminierung nimmt jedoch in einigen Fällen erheblich zu, wenn Wasserstoffatome von tertiären oder Carbinol-C-Atomen beteiligt sind. Dafür ist die geringe Dissoziationsenergie dieser Bindungen maßgebend.

Ich habe versucht die Hydroxysteroide je nach ihrer Dehydratisierungstendenz in zwei Gruppen einzuteilen :

1) Hydroxysteroide mit starker Wasserabspaltungstendenz
2) Hydroxysteroide mit geringer Wasserabspaltungstendenz

In der Gruppe 1 wurden Verbindungen aufgenommen, bei denen folgende Mechanismen postuliert werden können :

a) 1,4-Eliminierung aus der Wannenform
b) 1,4-Eliminierung über einen cyclischen Übergangszustand

Verbindungen, in denen diese 1,4-Eliminierungen nur möglich sind, wenn sich im Molekülion die Ringe A und B in der Wannenform befinden, wurden nur mit Vorbehalt in diese Gruppe aufgenommen.

In der Gruppe 2 wurden die Verbindungen zusammengefaßt, bei denen aus Modellbetrachtungen entweder kein Eliminierungsmechanismus oder nur eine 1,3-diaxiale Eliminierungsmöglichkeit vorausgesagt werden kann.

Dieses Einteilungsprinzip ist in Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2 : Zusammenfassung der mit Hilfe von Modellüberlegungen möglichen Aussagen über die Dehydratisierungstendenz von Monohydroxysteroiden.

| A/B-Ring-Verknüpfung | Position und Konfiguration der OH-Gruppe | |
|---|---|---|
| | Hydroxysteroide mit starker Wasserabspaltungstendenz - Gruppe a) | Hydroxysteroide mit geringer Wasserabspaltungstendenz - Gruppe b) |
| trans | | 1α-OH |
| trans | 1β-OH | |
| cis | 1α-OH | |
| cis | 1β-OH | |
| trans | 2α-OH | |
| trans | | 2β-OH |
| cis | 2α-OH | |
| cis | (2β-OH) | |
| trans | | 3α-OH |
| trans | | 3β-OH |
| cis | 3α-OH | |
| cis | | 3β-OH |
| trans | | 4α-OH |
| trans | | 4β-OH |
| cis | 4α-OH | |
| cis | (4β-OH) | |
| trans | 5α-OH | |
| cis | 5β-OH | |
| trans | (6α-OH) | |
| trans | | 6β-OH |
| cis | (6α-OH) | |
| cis | | 6β-OH |
| trans | | 7α-OH |
| trans | | 7β-OH |
| cis | 7α-OH | |
| cis | | 7β-OH |
| ---- | 11α-OH | |
| ---- | | 11β-OH |
| ---- | | 12α-OH |
| ---- | | 12β-OH |

## 5. Diskussion der Ergebnisse

Die folgende systematische Diskussion des Dehydratisierungsverhalten von Hydroxysteroiden basiert auf den in Tabelle 1 und 2 zusammengestellten Ergebnissen der Modellüberlegungen. Die betrachteten Abstandsverhältnisse in allen theoretisch möglichen Konformationen des Steroidringsystems können teilweise nur bei gleichzeitiger Betrachtung von Molekülmodellen eindeutig erkannt werden.

1-Hydroxysteroide : In 1-Hydroxysteroiden kann der A-Ring des Steroidskeletts ungehindert in die Wannenform umklappen, so daß mit einer einzigen Ausnahme (siehe unten) eine 1,4-Eliminierungsreaktion unter Beteiligung der an C-4 gebundenen Wasserstoffatome möglich ist.

Die einzige Ausnahme bilden A/B-trans-verknüpfte 1$\alpha$-Hydroxysteroide ; hier kann jedoch die axiale OH-Gruppe am C-Atom 1 mit dem 5$\alpha$-H- oder dem 9$\alpha$-H-Atom, die beide an sekundären C-Atomen gebunden sind, im Zuge einer 1,3-Eliminierung abgespalten werden.

Durch die Anwesenheit der Hydroxylgruppe in Stellung 1 wird aber auch die Spaltung der 1,10-Bindung erleichtert, so daß die Wasserelimination erst nach Bindungsspaltung erfolgen kann. Kommt dieser Spaltungsprozeß zum Tragen, so würde man beim Vergleich der Intensitäten der M-$H_2O$ Ionen in den Spektren der Isomeren kaum Unterschiede feststellen. Experimentelle Befunde fehlen noch.

Wir können vorhersagen, daß in isomeren 1,3-Dihydroxysteroiden die trans-Diole mit 1$\alpha$-, 3ß-OH sowie mit 1ß-, 3$\alpha$-OH-Konfiguration

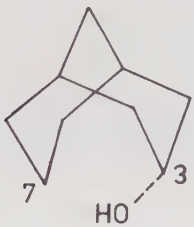
an intensiven M-18 Spitzen in den Massenspektren zu erkennen sein sollten : 1,3-diaxiale-cis-Eliminierung unter Beteiligung des aktivierten geminalen Carbinol-H-Atoms. Eine Bestätigung dieser Vorhersage erbrachten Untersuchungen von Herrn Schumann, der augenblicklich in unserer Arbeitsgruppe die Massenspektren von Androstanen mit Sauerstoffsubstituenten in den Positionen 1, 3 und 17 untersucht. Er konnte zeigen, daß im Massenspektrum von 1α, 3ß, 17ß-Trihydroxy-5α-androstan bevorzugt $H_2O$-Abspaltung eintritt. Die Intensität der M-18 Ionen im Spektrum von 1α, 3α, 17ß-Trihydroxy-5α-androstan, in dem die beiden OH-Gruppen in Stellung 1 und 3 cis-konfiguriert sind, ist dagegen wesentlich geringer.

2-Hydroxysteroide : In Isomeren mit 5α-H-Konfiguration und einer α-ständigen 2-Hydroxygruppe sollte im Zuge einer 1,4-Eliminierung leicht eine Wasserabspaltung möglich sein. In Verbindungen mit einer 2ß-konfigurierten OH-Gruppe und trans-verknüpften A/B-Ringsystem läßt sich dagegen keine günstige Eliminierungsmöglichkeit ableiten. Es ist daher vorherzusehen, daß sich die Verbindungen in den Massenspektren unterscheiden.

In 5ß-H-konfigurierten 2α-Hydroxysteroiden kann man im Dreiding-Modell des Moleküls die OH-Gruppe mit dem 6α-H-Atom nahezu zur Deckung bringen (Abstand $\ll 1$ Å ). Voraussetzung ist, daß sowohl der A-als auch der B-Ring in die Wannenform umklappen. Demnach wäre eine besonders leichte Dehydratisierung zu erwarten. Leider ist diese Vorhersage nicht nachprüfbar, da mir weder aus der Literatur noch aus unserer Massenspektrenkartei Spektren von 2α-Hydroxysteroiden vorlagen. Bei umgekehrter Anordnung der Substituenten, nämlich in 6α-Hydroxysteroiden mit cis-Verknüpfung des A/B-Ringsystems, ergeben sich jedoch völlig analoge

stereochemische Bedingungen. Im Spektrum des 6α-Hydroxy-5ß-androstan-3,17-dions sind allerdings keine auffallend hohen M-18 Spitzen vorhanden, obwohl das 2α-H-Atom durch die 3-Ketogruppe noch zusätzlich aktiviert ist [26]. Die Intensität der M-$H_2O$ Ionen ist nur wenig höher als im Massenspektrum von 6ß-Hydroxy-5ß-androstan-3,17-dion [14].

Eine Erklärung für diesen Befund erhält man durch Betrachtung von stereochemisch analog aufgebauten Verbindungen :
Die beschriebenen stereochemischen Verhältnisse von A/B-cis-verknüpften 2α- und 6α-Hydroxysteroiden sind gut vergleichbar mit den räumlichen Bedingungen im endo-3-Bicyclo[3.3.1]nonanol.




Die massenspektrometrische Wasserabspaltung dieser Verbindung wurde von MacLeod und Mitarb. [15] untersucht. Wenn beide Ringe in der Sesselform vorliegen, beträgt der am Molekülmodell gemessene Abstand vom Hydroxyl-O-Atom zum 7-endo-H-Atom nur 0,6 Å. Wenn die 7-endo Position mit Deuterium markiert ist, werden jedoch nur 11% des insgesamt eliminierten Wassers als HOD abgespalten. Die Hauptmenge des Wassers (60%) wird im Zuge einer 1,4-Eliminierung unter Abspaltung von Wasserstoffatomen aus den Positionen 6 und 8 eliminiert

(H--OH-Abstand = 1,8 Å). Da die Einführung eines 3-endo Substituenten im Bicyclo[3.3.1]nonan-Gerüst die Energie der "chair-chair" Konformation wesentlich erhöht, wodurch die "chair-boat" Konformation bevorzugt wird, kommt MacLoed zu dem Schluß, daß der wahre 7-endo-H-3-endo-OH-Abstand wesentlich größer ist, als der am einfachen Molekülmodell gemessene.

Zusammenfassend kann gesagt werden : Wenn sich beim Betrachten von Dreiding-Modellen Konformationen ableiten lassen, in denen der Atomabstand z. B. von Hydroxylsauerstoff- und Wasserstoffatomen nur 0,6 Å und weniger beträgt, so werden diese Konformationen vom Molekül nicht eingenommen, weil die Energieschwelle zu hoch ist.

3-Hydroxysteroide : Das Dehydratisierungsverhalten von 3-Hydroxysteroiden wird im Abschnitt II beschrieben.

4-Hydroxysteroide : In 4-Hydroxysteroiden mit A/B-trans-verknüpften A/B-Ringsystem beträgt der günstigste H--OH-Abstand 2,5 Å. Es ist zu erwarten, daß die $H_2O$-Eliminierungstendenz nur gering ist und eine konfigurationsbedingte Unterscheidung nicht möglich sein wird. In den Isomeren mit 5ß-H-Konfiguration können für die Wasserabspaltung 1,4-Eliminierungen postuliert werden. Die Dehydratisierungstendenz wird deswegen allgemein größer als in den 5α-H-Isomeren sein. Die stärkste Neigung zur Wasserelimination ist bei A/B-cis-verknüpften 4α-Hydroxysteroiden zu erwarten.

5-Hydroxysteroide : Abzuleiten ist eine hohe Neigung zur Abspaltung von Wasser. In den Massenspektren wird die Intensität der M-18 Ionen jedoch annähernd gleich sein. Diese Voraussage deckt sich mit den experimentellen Ergebnissen [27].

6-Hydroxysteroide : Sowohl bei A/B-trans- als auch bei A/B-cis Konfiguration ergeben sich für die 6α-Hydroxygruppe jeweils günstigere Eliminierungsmöglichkeiten (vgl. Tabelle 1) als für die 6ß-Hydroxygruppe. In den Spektren der 6-Hydroxy-5ß-androstan-3,17-dionen zeigt sich dieser Unterschied [26]. Die epimeren 6-Hydroxy-5α-androstan-3,17-dione sind an den M-18 Ionen massenspektrometrisch allerdings (entgegen der Voraussage) nicht zu unterscheiden [26].

7-Hydroxysteroide und 11-Hydroxysteroide : Die Intensität der $M-H_2O$ Ionen in den Massenspektren monofunktioneller 7-Hydroxyandrostane und 7-Hydroxycholestane ist unabhängig von der Konfiguration der Hydroxylgruppe und des H-Atoms an C-5 außergewöhnlich hoch (über 90%) [28]. Charakteristisch für die 7-Hydroxyandrostane ist zudem noch die hohe Neigung zur nachfolgenden Methylradikalabspaltung.

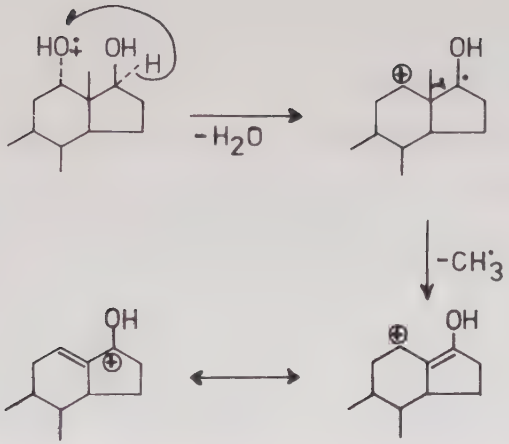
11-Hydroxypregnane [9,10] und 11-Hydroxyandrostane [11] mit zusätzlichen Sauerstoffunktionen in Stellung 3 und 20, bzw. 17, spalten, wie andere 11-Hydroxysteroide [6,29], bei Elektronenstoßionisierung leicht Wasser ab. Die Dehydratisierungstendenz der 11ß-Isomeren ist höher als die der 11α-Isomeren.

Dieses massenspektrometrische Verhalten der 7- und 11-Hydroxysteroide ist theoretisch nicht vorhersehbar (vgl. Tab. 1 und 2) und dürfte darauf zurückzuführen sein, daß primär ein Bindungsdruch erfolgt, weil die OH-Gruppe an einem C-Atom gebunden ist, das benachbart zu einem Brückenkopf-C-Atom steht.

12-Hydroxysteroide : Bei 12-Hydroxysteroide sollte die Konfiguration der OH-Gruppe aus den Massenspektren an der Intensität der M-$H_2O$ Ionen zu erkennen sein. Für 12ß-Hydroxysteroide läßt sich aus theoretischen Überlegungen kein Mechanismus für die $H_2O$-Abspaltung ableiten, in den 12 $\alpha$-Hydroxyverbindungen ist eine 1,3-diaxiale Wassereliminierung unter Beteiligung der $\alpha$-konfigurierten H-Atome aus den Positionen 9, 14 und 17 möglich.

Befindet sich an C-17 kein ß-konfigurierter Substituent, so wird die Spaltung der 17$\alpha$-H-Bindung wegen der höheren Dissoziationsenergie gegenüber den 9$\alpha$- und 14$\alpha$-H-Bindungen unbedeutend sein. Erst wenn im Steroidgerüst zusätzlich eine ß-konfigurierte OH-Gruppe in Position 17 vorhanden ist, wird die Energie der 17$\alpha$-H-Bindung erniedrigt und daher eine Spaltung im Zuge der Wassereliminierung ermöglicht. Zietz und Spiteller[30] konnten zeigen, daß im 17$\alpha$-$d_1$-5$\alpha$-Androstan-3ß,12$\alpha$, 17ß-triol bei Elektronenstoßionisierung überwiegend HOD abgespalten wird.

Da auch 12ß,17ß-Dihydroxyandrostane mit zusätzlicher Sauerstofffunktion an C-3 in hohem Maße zur Wasserabspaltung neigen (Ringbindungsbruch vor der $H_2O$-Eliminierung), ist die 12$\alpha$-,17ß-Diol-Konfiguration nicht allein an den hohen M-18 Spitzen im Massenspektrum zu erkennen. Vielmehr ist erst die starke Neigung zur nachfolgenden Methylradikalabspaltung aus den M-$H_2O$ Fragmenten in Zusammenhang mit der hohen Dehydratisierungstendenz charakteristisch für die Anordnung der Hydroxylgruppen im Steroidskelett [30]. Die gesamte Reaktion könnte folgendermaßen ablaufen (Schema 1 ) :




Schema 1 : Massenspektrometrische Dehydratisierung und nachfolgende Methylradikalabspaltung aus 12α,17ß-Dihydroxysteroiden

Das durch die Wasserelimination gebildete Radikal an C-17 ermöglicht die Abspaltung der C-18-Methylgruppe, wodurch ein mesomeriestabilisiertes M-33 Fragment entsteht. Durch die Bildung der energetisch stabilen M-33 Ionen wird diese Reaktionsfolge zum dominierenden Spaltungsvorgang in der Ionenquelle. Nur dadurch verläuft die $H_2O$-Abspaltung im ersten Schritt der Reaktion stereochemisch einheitlich.

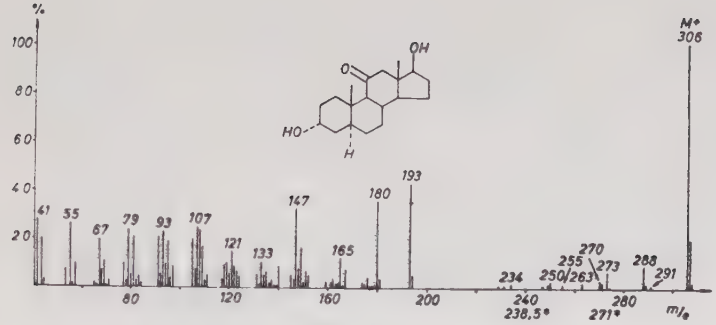
## II Massenspektrometrische Fragmentierung von 3-Hydroxysteroiden

### 1. Dehydratisierungsverhalten von 3-Hydroxysteroiden

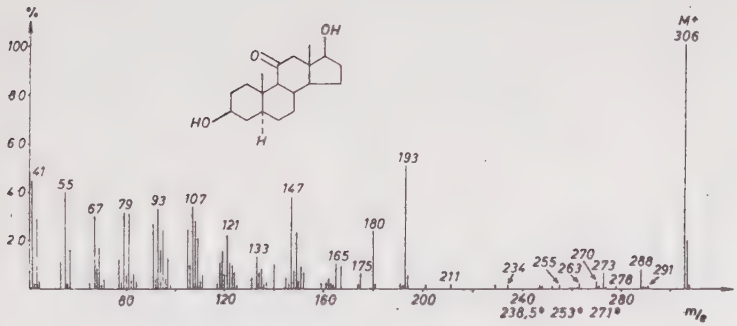
Beim Vergleich der Massenspektren der vier isomeren 3,17ß-Dihydroxy-androstan-11-one (Abb. 3-6) fällt auf, daß die Spektren der epimeren 3,17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-one fast identisch sind. Die Spektren der epimeren 3,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-one (Abb. 5 und 6) unterscheiden sich nicht nur deutlich von den Massenspektren der Isomeren mit 5α-H-Konfiguration, sondern weisen auch untereinander starke Unterschiede auf.

Im Spektrum von 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (5) fallen neben dem Hauptfragment-Ion der Masse 193 weitere intensive Schlüsselionen bei den Massen 234 (M-72) und 288 (M-18) auf, die in den Spektren der drei anderen Isomeren nur mit sehr viel geringerer Intensität auftreten. Die hohe Neigung zur Wasserabspaltung in A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden (vgl. Einleitung, Strukturelement 1 ) wurde zuerst von Egger und Spiteller[7] beobachtet. Da diese Verbindungen eine äquatoriale OH-Gruppe in Position 3 tragen und starke massenspektrometrische Wassereliminierung zuvor nur bei axialen Hydroxysteroiden festgestellt worden war[6], bestand zunächst der Verdacht, daß diese auffallend hohe Neigung zur $H_2O$-Eliminierung allein von der Verknüpfung des A/B-Ringsystems abhängig ist.

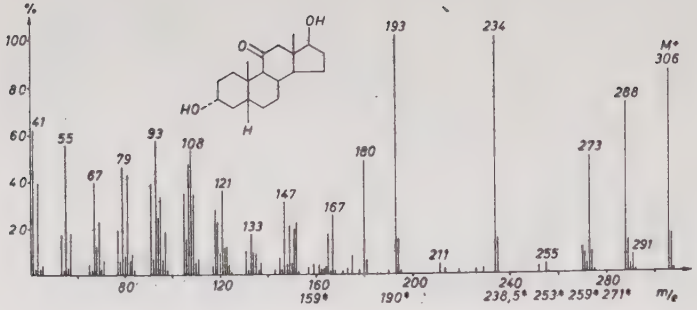
Auf Grund vergleichender Untersuchungen der Massenspektren von 3-Hydroxysteroiden und 3-Hydroxy-19-nor-steroiden kamen die Autoren jedoch zu dem Ergebnis, daß wegen der günstigen räumlichen Annäherung in der Wannenform des A-Ringes eine Beteiligung des 9α-H-Atomes bei dieser Fragmentierungsreaktion anzunehmen sei (vgl. Tabelle 1 ).



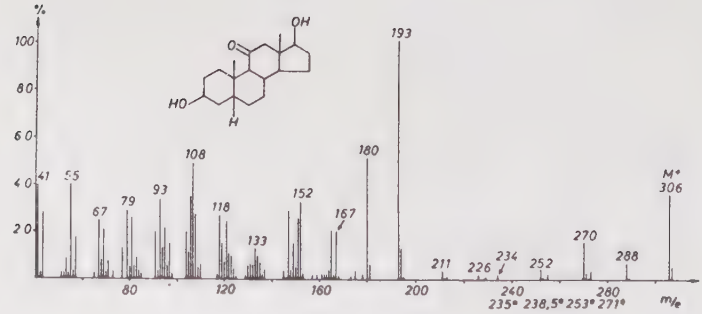

Abbild. 3 : Massenspektrum des 3α, 17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-ons




Abbild. 4 : Massenspektrum des 3ß, 17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-ons.




Abbild. 5 : Massenspektrum des 3α, 17ß, Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons



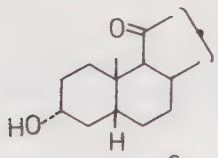

Abbild. 6 : Massenspektrum des 3ß, 17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons

## 2. Konfigurationsbedingte Bruchstückbildung von 3α-Hydroxysteroiden mit cis-Verknüpfung des A/B-Ringsystems

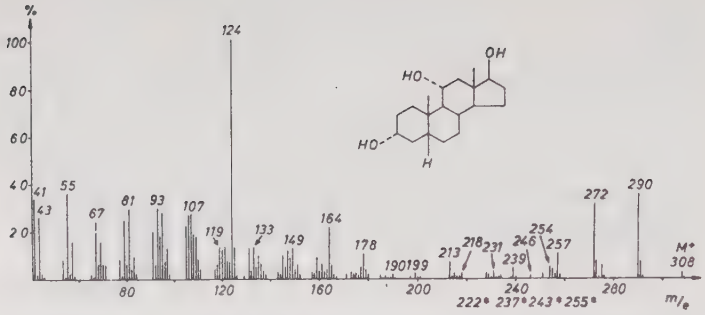
Die Genese des im oberen Massenbereiches des Spektrums von 5 (Abbild. 5) zu beobachtenden Fragment-Ions der Masse 234 läßt sich mit einer Weiterreaktion des M-18 Bruchstückes unter Abspaltung von Butadien, entsprechend einer Differenz von 54 ME, erklären. Erst das Auftreten dieser Schlüsseldifferenz erlaubt eine eindeutige Zuordnung der Konfiguration der 3-Hydroxygruppe und der A/B-Ringverknüpfung. Allein aus der hohen Intensität der $M-H_2O$ Ionen ist das nicht immer möglich.

Ersetzt man die 11-Ketogruppe durch eine α-bzw. ß-konfigurierte Hydroxylgruppe, so nimmt die Intensität der M-72 Ionen sehr stark ab, oder diese Ionen werden gar nicht mehr gebildet (Abbild. 7 und 8). Das gleiche gilt, wenn C-11 keinen Substituenten trägt (Abbild. 9 und 10).

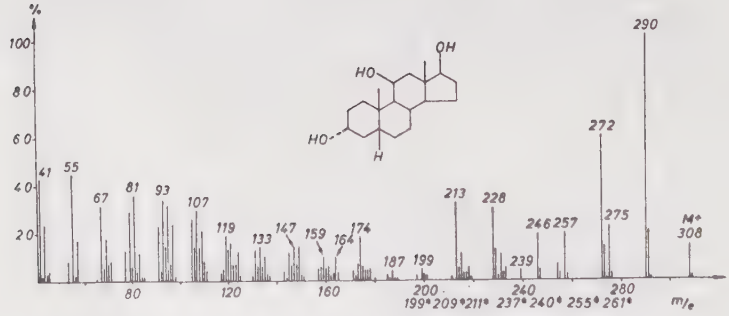
Für die Bildung der M-72 Schlüsselionen ist daher neben der A/B-cis-Verknüpfung und der α-Konfiguration der 3-Hydroxygruppe die Anwesenheit einer Carbonylgruppe in Position 11 zusätzliche Voraussetzung (Strukturelement 6).



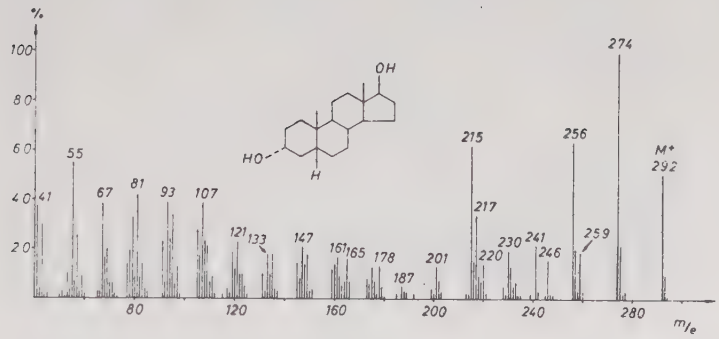

6



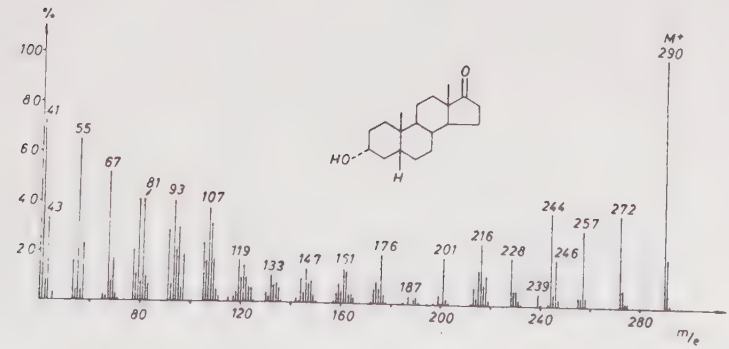

Abbild. 7 : Massenspektrum des 3α, 11α, 17ß-Trihydroxy-5ß-androstans



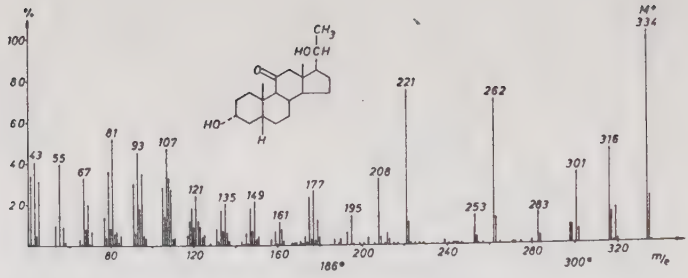

Abbild. 8 : Massenspektrum des 3α, 11ß, 17ß-Trihydroxy-5ß-androstans




Abbild. 9 : Massenspektrum des 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstans

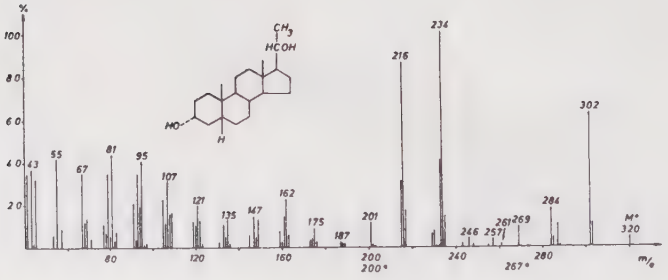



Abbild. 10 : Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-ons




Abbild. 11 : Massenspektrum des 3α,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-ons

Auch in Pregnanen mit dem Strukturelement 6 ist die Abspaltung von $H_2O$ und $C_4H_6$ eine bevorzugte Fragmentierungsreaktion.



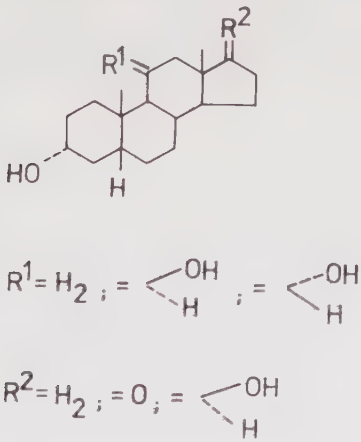

Abbild. 12 : Massenspektrum des 3α,20α-Dihydroxy-5ß-pregnans

Eine Schlüsseldifferenz von 46 ME ist im Gegensatz zu Androstanen in A/B-cis-verknüpften Pregnanen mit einer 3α-Hydroxygruppe nicht mehr zu beobachten.

In Androstanen, in denen die 11-Ketogruppe fehlt oder durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist, fallen jedoch Ionen auf, die durch Verlust eines 46 ME schweren Teilchens entstehen (Abbild. 7-10). Aus Hochauflösungsdaten läßt sich ableiten, daß diese Fragment-Ionen durch Abspaltung von Wasser und Äthylen aus dem Molekülion gebildet werden.

Im Gegensatz zur Bildung der M-72 Ionen, die unabhängig von der Substitution an C-17 bzw. C-20 in Androstanen und Pregnanen erfolgt, ist die Fragmentierung zu M-46 Ionen abhängig von der Substitution an C-17. Die Abspaltung von $H_2O$ und Äthylen tritt weder bei Pregnanen noch bei Steroiden mit $C_4$- oder $C_8$-Seitenkette auf. (Abbild. 11 und 12).

Die Abspaltung von $H_2O$ und $C_2H_4$ beobachtet man nur bei 3α-Hydroxy-5ß-androstanen und zwar unabhängig davon, ob C-17 eine Carbonylgruppe, eine Hydroxylgruppe oder gar keinen Substituenten trägt (Abbild. 13 sowie 7-10).

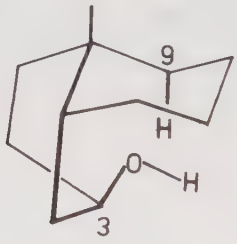



Abbild. 13: Nur Androstane dieser Konfiguration und Substitutionsart spalten massenspektrometrisch $H_2O$ und $C_2H_4$ ab.

## 3. Mechanistische Überlegungen zur Wasser- und Butadienabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden mit einer Ketogruppe in Position 11

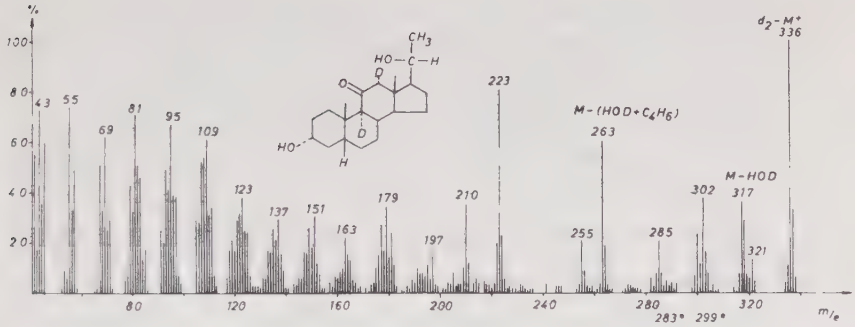
### a) Überlegungen zur Wassereliminierung am Modell :

Aus Modellbetrachtungen ergibt sich, daß nur bei A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden das Wasserstoffatom in Position 9 so stark an die 3-Hydroxygruppe angenähert werden kann, daß eine außerordentlich günstige Konformation für die Wasserabspaltung vorliegt. Der Abstand des 9α-H-Atoms zur 3α-Hydroxygruppe beträgt, wenn der A-Ring in die Wannenform umklappt, im Modell nur ca. 1-1,1 Å .




Aus energetischen Gründen wird jedoch im Molekülion ein derart geringer H--OH-Abstand nicht möglich sein (vgl. Abschnitt I.5 , S.22 ). Da nur in den Spektren von 3-Hydroxysteroiden mit dieser Konfiguration die Intensität der M-$H_2O$ Ionen im Vergleich zu den Spektren der anderen Isomeren sehr hoch ist (vgl. Abbild. 3-6), ist die Vermutung, daß die 9α-H-Bindung bei der Wassereliminierung gespalten wird, naheliegend [7]. Diese Annahme konnte ich durch einen Vorversuch bestätigen, indem ich im 3α,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-on, das ich während meiner Diplomarbeit synthetisiert

hatte, die H-Atome in den Position 9 und 12 gegen Deuterium austauschte. Im Spektrum dieser Verbindung (Abbild. 14) ist neben der $H_2O$-Abspaltung — hauptsächlich aus der 20ß-OH-Gruppe — deutlich eine HOD-Abspaltung, an einer Differenz von 19 Massen-einheiten, zu erkennen.




Abbild. 14: Massenspektrum des 9α,12α-$d_2$-3α,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-ons

Während meiner experimentellen Untersuchungen erschien eine Arbeit von Klein und Djerassi [31] in der die Beteiligung des 9α-H-Atomes bei der elektronenstoßinduzierten Dehydratisierung von 3α-Hydroxy-5ß-cholan mit Hilfe des Spektrums der in Stellung 9 deuterierten Verbindung nachgewiesen werden konnte. Im Massen-spektrum von 3α-Hydroxy-5ß-cholan ist jedoch weder eine Weiter-reaktion der M-18 Ionen unter Butadienabspaltung (es fehlt die zusätz-liche Carbonylgruppe in 11), noch ein nachfolgender Äthylenverlust (bisher nur bei Androstanen festgestellt) zu beobachten.

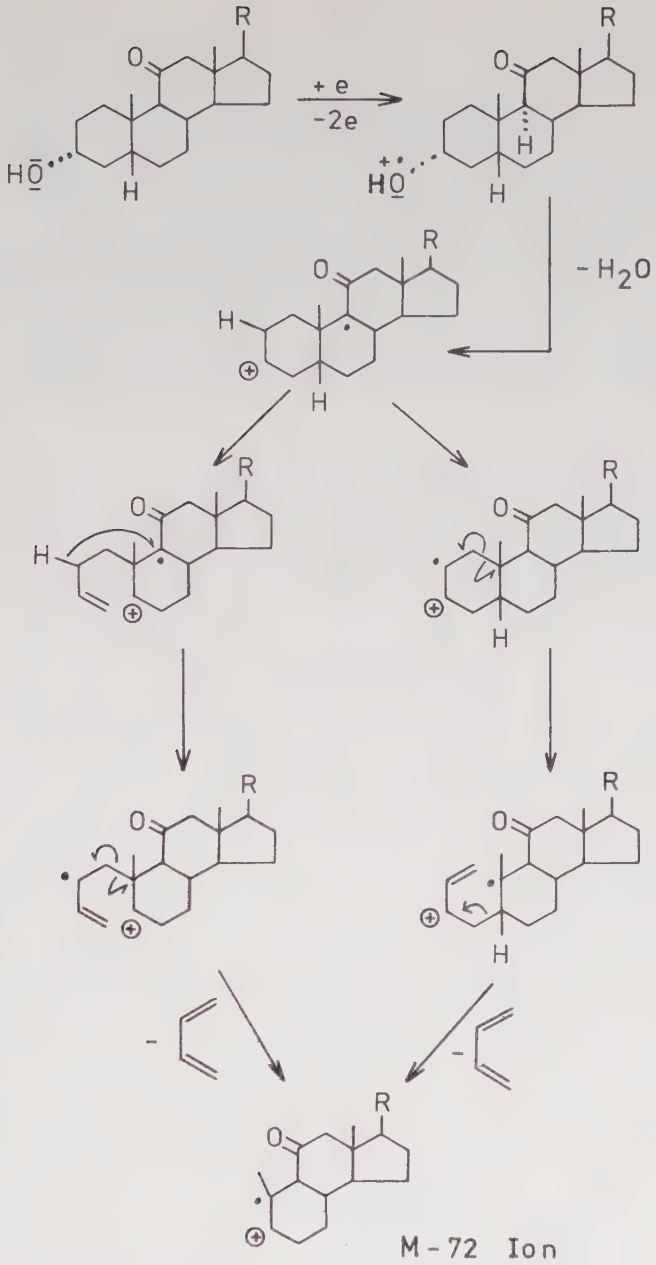
Außer dem günstigen H--OH-Abstand wird eine Spaltung der 9α-H-Bindung noch aus zwei Gründen besonders erleichtert : Einerseits ist die Dissoziationsenergie dieser Bindung relativ gering, weil eine tertiäre C-H-Bindung vorliegt, andererseits wird diese Position durch die benachbarte Carbonylgruppe an C-11 zusätzlich aktiviert.

b) Mechanismus der Butadienabspaltung :

Wie sich aus dem Vergleich von entsprechenden Spektren (Abbild. 5, 6 und 11) ergibt, wird aus Verbindungen, die das Strukturelement 6 enthalten, unabhängig von zusätzlichen Substituenten im B- oder D-Ring immer $H_2O$ und $C_4H_6$ (72 Masseneinheiten) abgespalten. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß nur aus dem A-Ring ohne zusätzliche Bindungsbrüche Butadien abspaltbar ist, führt zu der Annahme, daß die C-Atome 1 bis 4 eleminiert werden und die positive Ladung im Rest des Moleküls verbleibt.

Geht man davon aus, daß durch die Elektronenstoßionisierung ein Elektron aus dem nichtbindenen Elektronenpaar des Hydroxylsauerstoffs herausgeschlagen wird, so liegt nach der Dehydratisierung ein Fragment-Ion mit einer positiven Ladung an C-3 und einem Radikal in Position 9 vor (Schema 2). Durch "Umklappen" der 4, 5-Bindung können die Valenzen des C-3-Atoms abgesättigt werden und gleichzeitig die positive Ladung vom C-Atom in Position 5 übernommen werden.

Durch Ausbildung der Doppelbindung in Stellung 3, 4 sind die Wasserstoffe an C-2 aktiviert. Sie gehen somit bereitwillig eine Austauschreaktion radikalischer Art ein. Diese wird ausgelöst durch das radikalische Zentrum an C-9. Dementsprechend wandert ein H-Atom von C-2 nach C-9. In der Folge kommt es zur Spaltung der 1, 2-Bindung unter Verlust von Butadien.




Schema 2 : Mechanismus der Wasser- und Butadienabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden mit einer Carbonylgruppe in Position 11

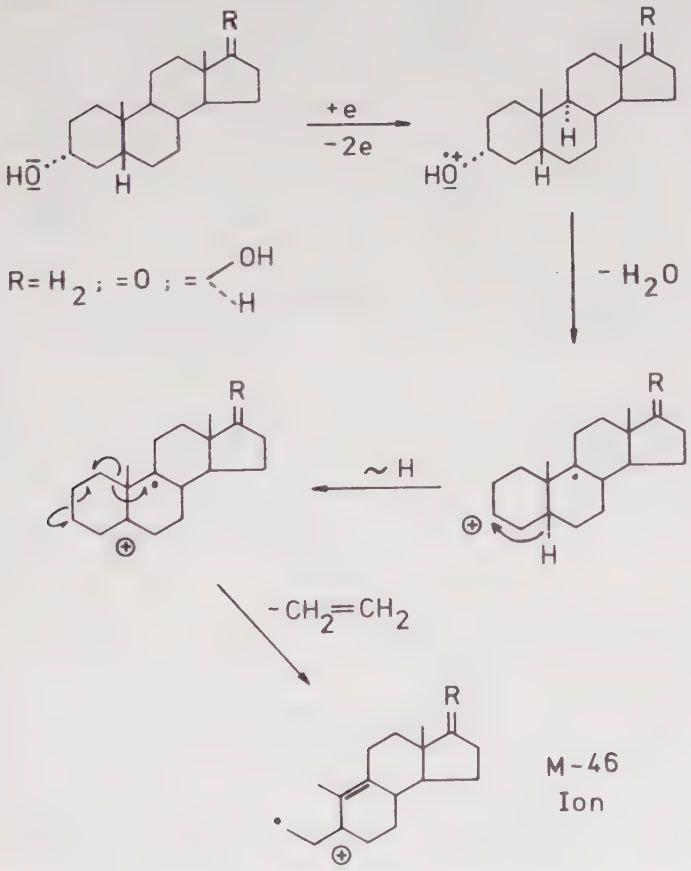
Eine Aktivierung der Wasserstoffatome an C-2 sollte ebenso durch die positive Ladung am C-Atom 3 möglich sein, so daß bereits im primär gebildeten M-18 Ion eine Wasserstoffverschiebung von C-2 nach C-9 erfolgen könnte. Im Anschluß an die Wasserstoffumlagerung wäre — bedingt durch das radikalische C-Atom 2 — die Spaltung der 1,10-Bindung möglich. Erst dann würde durch "Umklappen" der 4,5-Bindung Butadien eliminiert.

Mit diesem Formalismus läßt sich der Verlust von 72 Masseneinheiten aus dem Molekülion recht gut erklären. Es ist jedoch nicht ableitbar, warum die 11-Ketogruppe für diese Fragmentierungsreaktion essentiell ist.

4. Mechanistische Deutung der Wasser- und Äthylenabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden

Es ist anzunehmen, daß die unter Verlust von $C_2H_4$ und $H_2O$ ablaufende Spaltungsreaktion in A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden, die keine C-11 Ketogruppe tragen, wie bei der oben beschriebenen Fragmentierung durch eine Wassereliminierung unter Bildung eines analogen M-18 Bruchstückes eingeleitet wird. Für die Ableitung eines Mechanismus ist wichtig, daß die positive Ladung nicht am C-Atom 3 verbleiben kann.

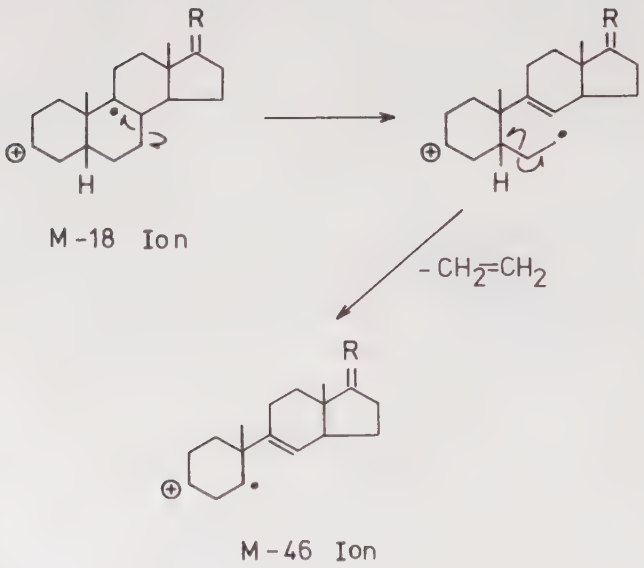
Es ergibt sich folgende Deutung :




Schema 3 : Mechanismus I der Wasser- und Äthylenabspaltung

Im M-$H_2O$ Fragment wandert die positive Ladung durch 1,3-Verschiebung des 5ß-H-Atoms an das tertiäre C-Atom 5, wo sie besser stabilisiert wird als an C-3. Das radikalische C-9-Atom löst zunächst einen Bindungsbruch zwischen C-1 und C-10 aus. Das an C-1 verbleibende Elektron bewirkt dann einen Bruch der 2,3-Bindung, wodurch schließlich Äthylen, das die C-Atome 1 und 2 enthält, abgespalten wird.

Daneben ist für die Äthylenabspaltung noch ein weiterer Mechanismus formulierbar, in dem im M-18 Ion zunächst die 7,8-Bindung und nachfolgend die 5,6-Bindung gespalten wird.




Schema 4 : Mechanismus II der Wasser- und Äthylenabspaltung aus A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden

In diesem Falle würden nicht die C-Atome 1 und 2, sondern C-6 und C-7 als Äthylen eliminiert.

Um die abgeleiteten Mechanismen zu beweisen, mußte ich die betrachteten Verbindungen entsprechend deuterieren.

## III Synthese der deuterierten Verbindungen

In dem Buch " Organic Reactions in Steroid Chemistry " von Fried und Edwards [32] findet man eine sehr gute Zusammenstellung der synthetischen Möglichkeiten zur Darstellung deuteriummarkierter Steroide. Auch Budzikiewicz, Djerassi und Williams [33] geben eine kurze Einführung in dieses Gebiet.

### 1. Berechnung des Deuteriertungsgrades aus dem Isotopenmuster der Molekülionen

Will man den Deuterierungsgrad einer synthetisierten deuteriummarkierten Verbindung ermitteln, so muß man von dieser Verbindung ein Massenspektrum aufnehmen und kann dann aus dem Isotopenmuster der Molekülionen den prozentualen Anteil der entsprechend deuterierten Verbindung berechnen [33, 34].

Die allgemeine Formel zur Berechnung der Intensitätsverteilung für n Atome eines Elementes A mit den Isotopen $^{x}A$, $^{y}A$, $^{z}A$, ... (x, y, z, ... sind die Isotopenmassen) lautet $( i_{x_A} + i_{y_A} \ldots )^{n}$. Wobei der Buchstabe i die Intensität des Isotopes bezeichnet, die in beliebiger Weise normiert (z. B. Prozent) eingesetzt werden kann.

Von den in der Organischen Chemie hauptsächlich vorkommenden Elementen kann man die Isotopenpeaks von Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff in erster Näherung vernachlässigen, nicht jedoch den $^{13}C$-Anteil bei Kohlenstoff, da Kohlenstoff zu 98,89% aus $^{12}C$ und 1,11% aus $^{13}C$ besteht. Die vollständige Auswertung der obigen Formel für eine Verbindung mit etwas höherer C-Zahl wäre relativ umständlich. Die Werte werden allerdings nach dem dritten Glied bereits so klein, daß man sie vernachlässigen kann. Zusätzlich ist eine weitere Vereinfachung möglich, wenn man das $^{12}C/^{13}C$ Verhältnis auf $i_1 = i_{^{12}C} = 1$ und $i_2 = i_{^{13}C} = 0,0112$ normiert. Dann ergibt sich für die Isotopenkombination $^{12}C_{n-1}\ ^{13}C$ für $i_2$ normiert ($i_1$ entsprechend $^{12}C_n = 100$) ein Wert von 1,12 n und für $^{12}C_{n-2}\ ^{13}C_2$ $i_3 = 1,25 \times 10^{-2}\ \frac{n(n-1)}{2}$ .

Die Berechnung sei nun an einem Beispiel erläutert: Es soll der Deuterierungsgrad des deuterierten 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons berechnet werden, die Summenformel der undeuterierten Verbindung ist $C_{19}H_{30}O_3$. Bei 19 Kohlenstoffatomen (n = 19) ist der normierte Wert für $i_2 = 1,12 \times 19$, also $i_2 = 21$. Für $i_3$ gilt entsprechend $i_3 = 1,25 \times 10^{-2}\ \frac{19 \times 18}{2}$ ; $i_3 = 2$ . Die Intensitätsverteilung des Molekülionen-Bereiches ist in Tab.3 angegeben.

Die Auswertung geht nun folgendermaßen vor sich : Der Anteil an $^{12}C_{18}\ ^{13}C_1\ ^{1}H_{30}\ O_3$ ergibt sich zu 21% ( = $i_2$) von 5 (abgerundet = 1) Einheiten $^{12}C_{19}\ ^{1}H_{29}\ ^{2}H_1\ O_3$ kommen somit 27 Einheiten von m/e 307 zu. m/e 308 setzt sich aus 3 Komponenten zusammen, deren Anteil für $^{12}C_{17}\ ^{13}C_2\ ^{1}H_{30}\ O_3$ 2% von 5 ( =0,1 ≈ 0) Einheiten, für $^{12}C_{18}\ ^{13}C_1\ ^{1}H_{29}\ ^{2}H_1\ O_3$ 21% von 27 (= 6) Einheiten ausmacht, so daß für $^{12}C_{19}\ ^{1}H_{28}\ ^{2}H_2\ O_3$ 64 Einheiten verbleiben. m/e 309 setzt sich wieder aus drei Komponenten zusammen, deren Anteile aus der Tabelle entnommen werden können. Das für m/e 309 Gesagte gilt in entsprechender Weise auch für m/e 310. In der letzten Spalte der Tabelle sind die zunächst in willkürlichen Einheiten berechneten Werte normiert.

Tabelle 3 : Berechnung des Deuterierungsgrades

| m/e | rel. Int. in willkürl. Einheiten | Isotopenkombinationen | Anteile d. einz. Isotopen-Komb. | Deuterierungsgrad |
|---|---|---|---|---|
| 306 | 5 | $^{12}C_{19}{}^{1}H_{30}O_3$ | 5 | 5% |
| 307 | 28 | $^{12}C_{18}{}^{13}C_1{}^{1}H_{30}O_3$ + $^{12}C_{19}{}^{1}H_{29}{}^{2}H_1O_3$ | 1 27 | 25% |
| 308 | 70 | $^{12}C_{17}{}^{13}C_2{}^{1}H_{30}O_3$ + $^{12}C_{18}{}^{13}C_1{}^{1}H_{29}{}^{2}H_1O_3$ + $^{12}C_{19}{}^{1}H_{28}{}^{2}H_2O_3$ | 6 64 | 60% |
| 309 | 23 | $^{12}C_{17}{}^{13}C_2{}^{1}H_{29}{}^{2}H_1O_3$ + $^{12}C_{18}{}^{13}C_1{}^{1}H_{28}{}^{2}H_2O_3$ + $^{12}C_{19}{}^{1}H_{27}{}^{2}H_3O_3$ | 1 13 9 | 8% |
| 310 | 5 | $^{12}C_{17}{}^{13}C_2{}^{1}H_{28}{}^{2}H_2O_3$ + $^{12}C_{18}{}^{13}C_1{}^{1}H_{27}{}^{2}H_3O_3$ + $^{12}C_{19}{}^{1}H_{26}{}^{2}H_4O_3$ | 1 2 2 | 2% |

## 2. Synthese der deuterierten Verbindungen zur mechanistischen Untersuchung der Wasser- und Butadienabspaltung

### Überlegungen zur Wahl geeigneter Ausgangsverbindungen :

Zum Beweis des postulierten Mechanismus mußten A/B-cis-verknüpfte 3$\alpha$-Hydroxysteroide, die in Position 11 eine Ketogruppe tragen, entsprechend deuteriert werden.

Für die stereochemische Wasserabspaltung im ersten Schritt des Fragmentierungsprozesses wurde die Beteiligung des 9$\alpha$-H-Atoms angenommen. Um diese Eliminierung durch eine elektronenstoßinduzierte HOD-Abspaltung nachweisen zu können, mußte in den betrachteten Verbindungen das 9$\alpha$-H-Atom gegen Deuterium ausgetauscht werden. In meiner Diplomarbeit hatte ich 3$\alpha$,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-on synthetisiert. Da es prinzipiell möglich ist, enolisierbare H-Atome neben Carbonylgruppen gegen Deuterium auszutauschen, wäre 3$\alpha$,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-on eine leicht zugängliche Verbindung für den Nachweis einer HOD-Abspaltung :
In einem Vorversuch tauschte ich deswegen in alkalischem Medium den Wasserstoff des 3$\alpha$,20ß-Dihydroxy-5ß-pregnan-11-ons in den Positionen 9 und 12 durch Deuterium aus, um zu sehen, ob überhaupt Deuterium aus der Position 9 abgespalten wird (vgl. Abschnitt II 3., Abbild. 14). Am Massenspektrum dieses deuterierten Pregnanderivates sieht man, daß diese Verbindungsklasse aus zwei Gründen für die Untersuchung des Mechanismus der Wasser- und Butadienabspaltung nicht geeignet ist :

1.) Einmal wird neben der HOD-Eliminierung noch eine relativ starke $H_2O$-Abspaltung (zusätzliche OH-Gruppe in Position 20) beobachtet. Es läßt sich deshalb nicht abschätzen in welchem Maße das 9$\alpha$-D-Atom bei der Abspaltung der 3$\alpha$-OH-Gruppe in Form von HOD beteiligt ist.

2.) tritt wegen der zusätzlich vorhandenen Fragment-Ionen im oberen Massenbereich des Spektrums der eigentlich zu beobachtende Spaltungsprozeß nicht deutlich genug hervor.

Um die begleitende Wasserabspaltung neben der HOD-Eliminierung zu umgehen, hätte ich auch 3α-Hydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion in gleicher Weise deuterieren können. Beim Austausch der aktivierten H-Atome neben den Carbonylgruppen, bekäme man dann jedoch 4 Deuteriumatome zusätzlich ins Molekül, wodurch das gesamte Fragmentierungsverhalten zunehmend unübersichtlicher wird.

Eindeutige Resultate sind daher nur erhältlich, wenn man

a) Nebenreaktionen beim massenspektrometrischen Abbau möglichst unterdrückt

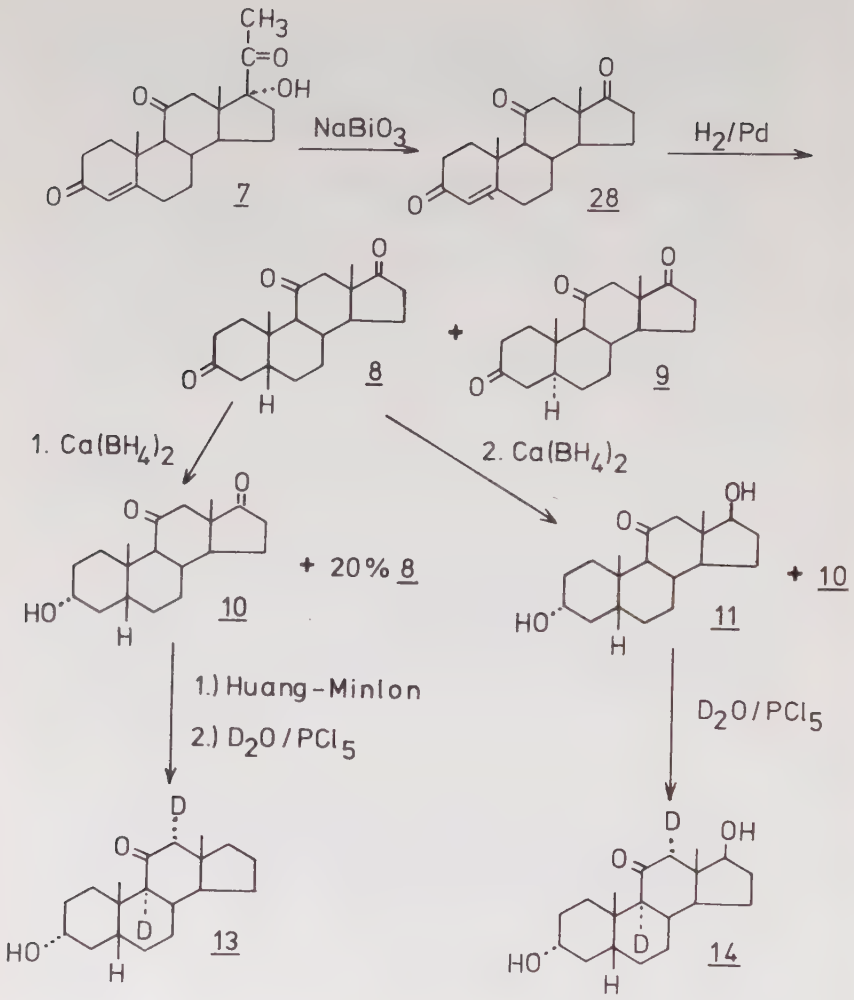
b) nicht zu viele D-Atome in das Molekül einbaut.

Diese Bedingungen werden am besten von einem A/B-cis-verknüpften bifunktionellen Androstan mit einer 3α-Hydroxygruppe und einer Ketofunktion in Position 11 erfüllt.

a) Synthese von 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14)

Als geeignetes Ausgangsmaterial stand mir Cortison (7), das uns die Firma Schering, Berlin, der auch hier sehr gedankt sei, überließ, zur Verfügung.

Durch Seitenkettenabbau und nachfolgende selektive Entfernung des Sauerstoffsubstituenten in Stellung 17 wurde in folgender Weise die angestrebte Verbindung 14 erhalten:
Nach oxydativem Abbau der Seitenkette mit Natriumbismutat [35] erhielt ich durch Hydrierung über Palladium (10% Pd auf Calciumkarbonat) bei Normaldruck in methanolischer Lösung ein Isomeren-




Schema 5 : Synthese von 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14).

gemisch der Androstan-3,11,17-trione. Durch Mehrfach- und Stufenchromatographie an Kieselgel-Dünnschichtplatten kann aus diesem Gemisch 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) und 5α-Androstan-3,11,17-trion (9) im Verhältnis 27:73 isoliert werden (Schema 5). Da die präparative Dünnschichtchromatographie zur Trennung großer Substanzmengen nicht sehr vorteilhaft ist, führte ich die chromatographische Trennung von 8 und 9 auch mit Hilfe einer Celite/Aktivkohlesäule durch. Das Ergebnis war jedoch bei weitem nicht so zufriedenstellend wie bei der während der Diplomarbeit durchgeführten Trennung von 5α- und 5ß-Pregnan-11,20-dion-11α-ol [8,9].

Die bei der Hydrierung angestrebte Verbindung war das in geringerer Menge als 9 entstandene 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8). Um die Ausbeute an 5ß-H-Isomeren bei der Hydrierung zu erhöhen, wird empfohlen in basischen Medien zu hydrieren.

Durch Hydrierung in N,N-Dimenthylformamid statt Methanol konnte die Ausbeute von 8 jedoch nicht erhöht werden. Das Verhältnis von 5ß- zu 5α-H-Isomeren verschob sich im Gegenteil noch stärker zu Ungunsten des 5ß-Androstan-3,11,17-trions (8), nämlich auf 20:80. Bei Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel wurde das 4-Androsten-3,11,17-trion unter den angewandten Bedingungen nicht mehr hydriert.

Im nächsten Reaktionsschritt mußte die 17-Ketogruppe in 8 durch Huang-Minlon-Reduktion entfernt werden. Zu diesem Zweck mußte die Carbonylgruppe in Position 3 partiell geschützt oder reduziert werden. Die 11-Ketogruppe geht aus stereochemischen Gründen praktisch keine Carbonylreaktion ein und wird deshalb auch bei dieser Reduktionsmethode innerhalb der üblichen Reaktionszeiten nicht angegriffen.

Es ist bisher kein Verfahren beschrieben worden, das es erlaubt, die 3-Ketogruppe in einfacher Weise und mit genügender Ausbeute

partiell neben der 17-Carbonylgruppe zu ketalisieren. Die von Vorbrueggen [36] beschriebene Ketalisierung mit Dimethylformamidäthylenketal, mit der er 5α-Pregnan-3,20-dion-3-äthylenketal in 70 proz. Ausbeute herstellte, ist nur bei A/B-trans-verknüpften 3-Ketosteroiden anwendbar. Auch 3-Thioketale lassen sich bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Carbonylgruppe in 17 nicht in vertretbaren Ausbeuten gewinnen [37].

Die partielle Reduktion von Androstan-3,11,17-trionen in der Position 3 mit einem geringen Unterschuß $NaBH_4$ in Methanol verläuft auch bei 0°C im allgemeinen nicht so günstig, wie in der Literatur angegeben ist [38]. Ensprechende Reduktionsversuche wurden mit dem ebenfalls isolierten 5α-Androstan-3,11,17-trion (9) durchgeführt und als Hauptprodukt die sowohl in 3 als auch in 17 reduzierte Verbindung erhalten. Deshalb wandte ich die bereits an Pregnan-3,11,20-trionen erprobte [8] Reduktion mit $Ca(BH_4)_2$ in äthanolischer Lösung bei -25°C an [39]. In einem Vorversuch konnte ich auf diese Weise nach dünnschichtchromatographischer Trennung und Reinigung neben 20% Ausgangsverbindung 8 noch 3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion (10) in 40 proz. Ausbeute isolieren.

Bei der Reduktion von 9 entstand 38% 3ß-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion und geringe Mengen 3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-on (25). 17% von 9 wurden zurückgewonnen.
Diese Ergebnisse zeigen, daß die Calciumborhydridreduktion auch bei Androstan-3,11,17-trionen zur partiellen Reduktion der 3-Ketogruppe angewendet werden kann.

Bei der Wiederholung der $Ca(BH_4)_2$-Reduktion von 8 mit größerer Einwaage des Trions 8, erhielt ich jedoch neben 10 einen ziemlich großen Anteil des in 3 und 17 reduzierten 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (11). Es zeigte sich, daß deuterierte Produkte der Verbindung 11 ebenfalls zur Untersuchung des Fragmentierungsmechanismus herangezogen werden können.

Durch Huang-Minlon-Reduktion von 10 erhielt man in glatter Reaktion 3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (12).

Der Austausch von H-Atomen in enolisierbaren Positionen von Carbonylgruppen kann im basischen und sauren Medium erfolgen. Wie die Auswertung entsprechender Versuche ergab, verläuft der säurekatalysierte Austausch mit einer Mischung von Phosphoroxychlorid und Deuteriumchlorid, hergestellt aus Deuteriumoxid und Phosphor(V)-chlorid, in Monodeuteromethanol [40] wesentlich rascher und mit besseren Ausbeuten als der basekatalysierte Austausch.

Beim 16stündigen säurekatalysierten H-D-Austausch (Sieden unter Rückfluß) von 3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (12) ergibt sich ein Isotopenverhältnis von 15% $d_o$, 27% $d_1$ 56% $d_2$ und 2% $d_3$. 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) entsteht also dabei mit 56 proz. Ausbeute, was für die Betrachtung der massenspektrometrischen HOD-Abspaltung völlig ausreichend ist.

Deuteriert man 11 in gleicher Weise, so erhält man abhängig von den Austauschzeiten folgende Isotopenverhältnisse :

a) 5stündiger H-D-Austausch : 6% $d_o$, 20% $d_1$, 46% $d_2$, 25% $d_3$, 4% $d_4$

b) 11stündiger H-D-Austausch : 5% $d_o$, 25% $d_1$, 60% $d_2$, 8% $d_3$, 2% $d_4$

c) 18stündiger H-D-Austausch : 4% $d_o$, 5% $d_1$, 47% $d_2$, 35% $d_3$, 25% $d_4$

Die beste Ausbeute an 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) wurde nach 11stündigem Rückflußsieden von 11 mit einem $D_2O/PCl_5$-Gemisch in Monodeuteromethanol erhalten.

Interessanterweise wird beim ca. 24stündigen Austausch von 3ß-Hydroxy-5α-androstan-11-on nur ein Wasserstoffatom gegen Deuterium ausgetauscht. Auf Grund des massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens und aus Literaturangaben über die Deuterierung

ähnlicher Verbindungen, konnte das Deuteriumatom in Position 9 lokalisiert werden. Die gleiche Beobachtung wurde bei der Deuterierung von 5α-Androstan-11-on in saurem Medium gemacht [32]. Bei der basekatalysierten Deuterierung der gleichen Verbindung ist bereits nach 20 min neben dem 9α-H-Atom auch das 12α-H-Atom gegen Deuterium ausgetauscht [31, 41].

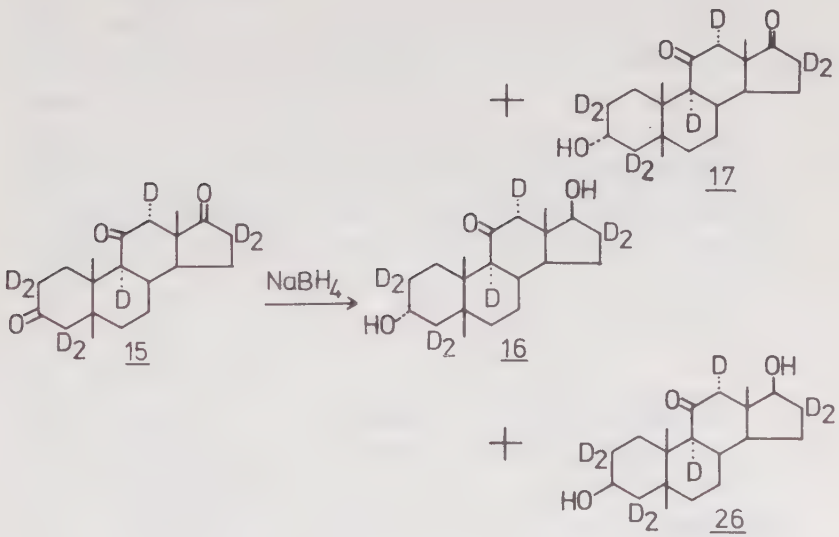
Wie das Massenspektrum des 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (14) zeigt (vgl. Abbild. 16), kann in dieser Verbindung, trotz der zusätzlichen Hydroxylgruppe an C-17, die Abspaltung der 3α-Hydroxygruppe als HOD ohne Störung von M-$H_2O$-Ionen beobachtet werden ; die 17ß-Hydroxygruppe wird nämlich erst in einer Folgereaktion aus dem M-18-Fragment in Form von Wasser eliminiert. Deswegen wird auch die nachfolgende Butadienabspaltung vornehmlich an dem im A-Ring deuterierten 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on untersucht, das aus Cortison mit höherer Ausbeute als 12 gewonnen werden kann.

b) Synthese von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) und 2,2,4,4,-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19)

Mit den deuterierten Verbindungen 13 und 14 kann die Abspaltung der 3α-OH-Gruppe zusammen mit dem 9α-Deuteriumatom nachgewiesen werden. Für den Beweis der Wasserstoffverschiebung (Deuteriumverschiebung) von C-2 nach C-9 synthetisierte ich die folgenden Verbindungen :

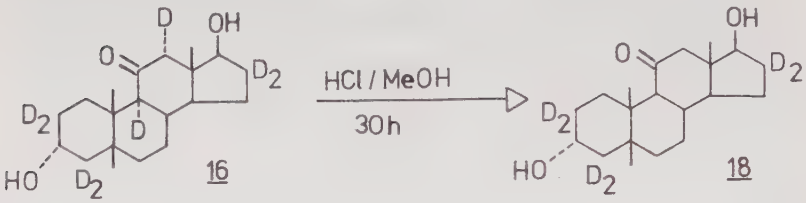
Durch zweimaligen 24stündigen säurekatalysierten Austausch der enolisierbaren Wasserstoffatome wurde 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) in das 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-5ß-Androstan-3,11,17-trion (15) mit folgender Isotopenverteilung überführt : 8% $d_6$, 20% $d_7$, 61% $d_8$,

11% $d_9$. Anschließend wurde 15 mit Natriumborhydrid in methanolischer Lösung reduziert. Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung des Reaktionsgemisches erhielt ich 65% 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (16) (62% $d_8$), 5% des epimeren 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3ß,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (26) und 8% 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion (17). 16 und 17 wurden zur weiteren Reinigung nocheinmal an Dünnschichtplatten chromatographiert.

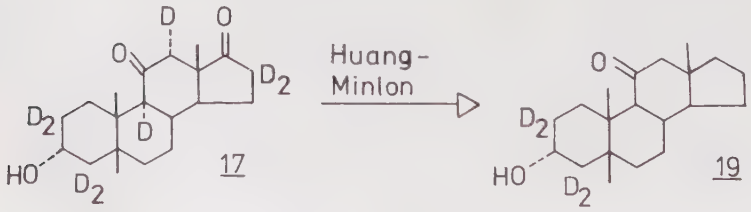



Durch 30stündiges Sieden unter Rückfluß in einer etwa 4 proz. methanolischen Salzsäure wurden in 16 die Deuteriumatome in den Positionen

9α und 12α gegen Wasserstoff rückgetauscht, das so erhaltene 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) erhält 72% $d_6$ sowie 20% $d_7$ und nur noch 3% $d_8$. Ein 4stündiger basekatalysierter Rücktausch in 0,2 normaler methanolischer Natriumhydoxidlösung verschob das Isotopenmuster der Ausgangsverbindung 16 nur unwesentlich.




Die Verbindung 17 kann ohne vorherigen Rücktausch der D-Atome in den aktiven Positionen, durch Huang-Minlon-Reduktion direkt in das 2,2,4,4-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19) überführt werden :



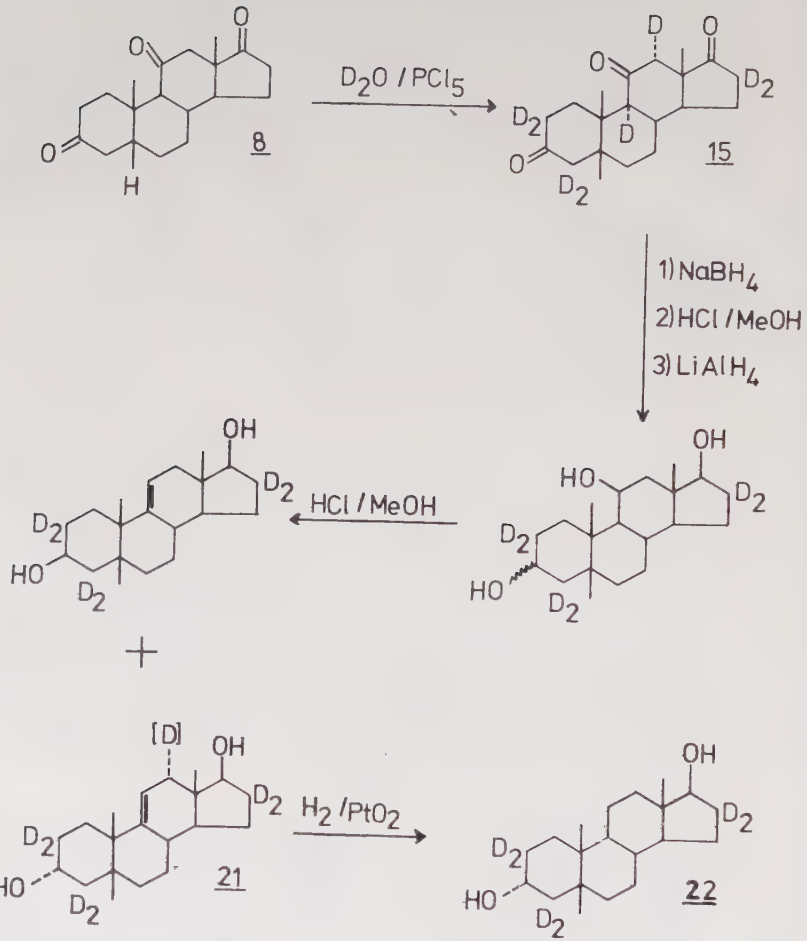
## 3. Synthese der deuterierten Verbindungen zur mechanistischen Untersuchung der Wasser- und Äthylenabspaltung

Die Genese der Ionen in den Massenspektren von 3α-Hydroxy-5ß-androstanderivaten, die einem Verlust von 28 Masseneinheiten aus den M-18-Fragmenten entsprechen, läßt sich mechanistisch so deuten, daß die C-Atome 1 und 2 des A-Ringes in Form von Äthylen eliminiert werden. Zum Beweis markierte ich die Position 2 (aus synthesetechnischen Gründen zusätzlich die Positionen 4 und 16) im 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (20) mit Deuterium.

### a) Synthese von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22)

Ausgehend von 8 wurde wie zuvor beschrieben (Kapitel III 2. b) 15 hergestellt. 15 wurde zunächst mit Natriumborhydrid in den Positionen 3 und 17 reduziert, um anschließend die D-Atome in 9 und 12 gegen Wasserstoff rücktauschen zu können. Erst dann wurde die 11-Ketogruppe mit Lithiumaluminiumhydrid zur 11ß-Hydroxygruppe reduziert. Das so erhaltene Isomerengemisch, das zum überwiegenden Teil aus 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,11ß,17ß-Trihydroxy-5ß-androstan bestand, wurde ohne Reinigung und Trennung zur Dehydratisierung der 11ß-Hydroxygruppe in methanolischer Salzsäure unter Rückfluß erhitzt.

Erst jetzt wurde das in geringer Menge neben dem Hauptprodukt entstandene deuterierte 3ß,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (27) durch Dünnschichtchromatographie abgetrennt. Entgegen den Erwartungen bestand das Hauptprodukt nicht zum größten Teil aus dem $d_6$-Isotop, sondern aus 2,2,4,4,12,16,16-$d_7$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (21). Auf Grund der vorangegangenen Syntheseschritte und des Verhaltens von 21 bei der katalytischen Hydrierung läßt sich das zusätzliche D-Atom dem C-Atom 12 zuordnen.




Schema 6 : Synthese von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22)

Wahrscheinlich ist der 10stündige D-Rücktausch in salzsaurem Methanol nicht vollständig verlaufen. Möglich ist aber auch, daß die 11-Ketogruppe bereits bei der $NaBH_4$-Reduktion (wegen des großen Überschusses an $NaBH_4$) teilweise mitreduziert wurde und die 11ß-OH-Gruppe dann beim nachfolgenden Sieden in der HCl/MeOH-Mischung (zur Entfernung der 9α- und 12α-D-Atome) abgespalten wurde.

Die Hydrierung der 9(11)-Doppelbindung in 21 ist ziemlich schwierig :

Bei der Behandlung einer methanolischen Lösung von 21 unter Zugabe eines Palladiumkatalysators (10% Pd auf $CaCO_3$) mit Wasserstoff bei Normaldruck findet keine Umsetzung statt. Erst nach 16stündiger Hydrierung über Platin(IV)-oxid in Eisessig konnte ein Produkt isoliert werden, das zu 85% aus 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) bestand.

Wie das Isotopenverhältnis der gereinigten Verbindung 22 zeigt (7% $d_4$, 8% $d_5$, 60% $d_6$, 20% $d_7$, 5% $d_8$), ist bei der katalytischen Hydrierung von 21 das allylische D-Atom in der Position 12 erwartungsgemäß größtenteils gegen Wasserstoff ausgetauscht worden[32].

b) Deuterierung der Doppelbindung in 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23)

23 wurde analog zu der entsprechend deuterierten Verbindung 21 aus 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (11) dargestellt, indem die 11-Ketogruppe mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert und die 11ß-OH-Gruppe dann säurekatalytisch eliminiert wurde.

Ich erwog zuerst, die 9(11)-Doppelbindung in 23 stereospezifisch mit Lithium in $ND_3$ zu reduzieren. Diese Methode kann aber nur angewandt werden, wenn sich in Konjugation zur Doppelbindung eine

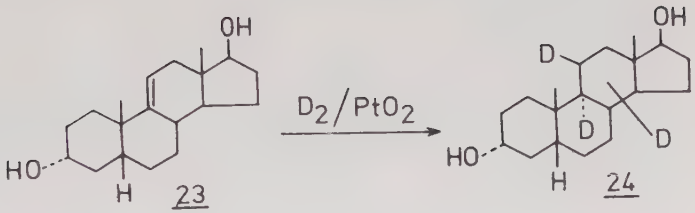
weitere, aber polare Doppelbindung befindet. Es mußte deshalb die Deuterierung dieser Doppelbindung mit Deuteriumgas versucht werden. Grundsätzlich kann das entweder mit einem heterogenen oder mit einem homogenen Katalysator erfolgen.

Das Problem bei der Deuterierung mit einem heterogenen Kata - lysator ist, daß nicht nur zwei , sondern weitaus mehr Deuterium - Atome in unspezifischer Weise in das Molekül eingeführt werden. Während vinylische H-Atome kaum ausgetauscht werden ist der Austausch der allylischen H-Atome nahezu vollständig. Dieser sogenannte " scrambling " ist auch etwas abhängig vom Katalysator : Bei Verwendung von Platin(IV)-oxid erhält man eine höhere Isotopen-Reinheit als beim Gebrauch von Palladium-Katalysatoren [32].

Bei der homogenen Katalyse mit tris-(Triphenylphosphin)- chlororhodium erhält man zwar sehr isotopenreine Verbindungen, die Deuterierung verläuft aber umso langsamer, je höher substituiert die Doppelbindung ist ; tetrasubstituierte Doppelbindungen reagieren gar nicht mehr [42].

Gallagher [43] beschreibt die Deuterierung von 3α, 20ß-Dihydroxy-5ß-pregn-9(11)-en in Monodeuteroessigsäure in Anwesenheit eines Adams-Katalysators ($PtO_2$). Er erzielte nach sechstägiger Reaktionszeit und mehrmaliger Zugabe von frischem Katalysator keine vollständige Umsetzung.

Unter gleichen Bedingungen deuterierte ich 1 mg 3α, 17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) 7 Tage in einer Mikroapparatur. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Hilfe der Kombination Gaschromatograph und Massenspektrometer analysiert. Dabei zeigte sich, daß nur 16% von 23 deuteriert worden war. Aus der Isotopenverteilung der deuterierten Verbindung ist zu entnehmen, daß hauptsächlich 3 Deuteriumatome in das Molekül eingeführt wurden.


OH
HO
H
23
D2/PtO2
OH
D
D
D
HO
H
24

## IV Diskussion der Massenspektren

### 1. Allgemeines

Bei der Untersuchung massenspektrometrischer Fragmentierungsmechanismen reicht es meistens nicht aus, mit der Hochauflösungstechnik die exakte Bruttoformel der Fragment-Ionen zu bestimmen. Insbesondere dann, wenn im Zuge der Bruchstückbildung Wasserstoffatome umgelagert werden, benötigt man Informationen über die Art der Wasserstoffverschiebung. So ergibt sich bei der Wassereliminierung im Massenspektrometer die Frage, welches H-Atom der zu untersuchenden Verbindung zusammen mit der Hydroxylgruppe abgespalten wird.
Es gibt zwei Möglichkeiten zur Untersuchung massenspektrometrischer Fragmentierungsprozesse :

#### 1) Markierung

Eine geeignete Markierung in der Massenspektrometrie ist der Austausch von Wasserstoffatomen gegen das um eine Masseneinheit schwerere Isotop Deuterium. Aus einer entsprechenden Massenverschiebung der Bruchstückionen oder aus veränderten Schlüsseldifferenzen kann man ableiten, ob das Deuteriumatom im Verlauf des Spaltungsprozesses zusammen mit dem Neutral- oder Radikalteil abgespalten wurde oder im Fragment-Ion verblieben ist. In nicht ganz eindeutigen Fällen ist es ratsam, die exakte Bruttoformel des Fragmentions mit der Hochauflösungstechnik zu ermitteln.

#### 2) DADI-Technik

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Fragmentierungsreaktionen besteht darin, daß man die sogenannten metastabilen Übergänge analysiert. Die mittlere Aufenthaltszeit der Molekül-

ionen in der Ionenquelle beträgt $10^{-6}$ sec. Die Gesamtzeit von der Bildung bis zur elektrischen Registrierung der positiven Ionen beträgt etwa $10^{-5}$ sec.. Im allgemeinen ist die Bruchstückbildung nach $10^{-7}$ sec. abgeschlossen. Es gibt aber auch eine große Zahl von Zerfällen, deren Reaktionszeit größer als $10^{-6}$ sec. ist und die deshalb erst außerhalb der Ionenquelle während des Durchfliegens der elektronenoptischen Ablenkstrecke zum Abschluß kommen. Ionen, die erst außerhalb der Ionenquelle entstehen, werden zwar noch mit der Masse des Mutterions beschleunigt, beschreiben dann aber völlig andere Ablenkbahnen. Dies führt dazu, daß weder bei der Masse des Mutterions ($m_1$) noch bei der Masse des Tochterions ($m_2$) eine Abbildung erfolgt, sondern man erhält ein breites Signal bei einer fiktiven Masse $m^*$. Die mathematische Verknüpfung zwischen $m^*$, $m_1$ und $m_2$ wird durch folgende Formel wiedergegeben :

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$$

In den letzten Jahren ist eine Methode entwickelt worden, die es erlaubt, in einem Spektrum alle Tochterionen zu registrieren, die durch metastabile Zerfälle aus einem Mutterion gebildet werden. Dabei werden doppelfokussierende Massenspektrometer verwendet, in denen die Ionen nach Austritt aus der Ionenquelle zunächst das magnetische Feld durchlaufen und erst dann das elektrische Feld passieren (umgekehrte Nier-Johnson-Geometrie). Zusätzlich muß die Möglichkeit bestehen, die Spannung (ESA-Spannung) des elektrischen Feldes und damit die Feldstärke unabhängig von der Magnetfeldstärke zu variieren (entkoppelte ESA-Spannung). Bei der Messung geht man im einzelnen folgendermaßen vor : Das Magnetfeld wird auf ein interessierendes Mutterion eingestellt und dann die entkoppelte ESA-Spannung (wobei mit dem gekoppelten Wert $E_o$ begonnen wird) verringert. Die bei verschiedenen

ESA-Spannungen E auftretenden Peaks stellen Tochterionen dar, die durch den metastabilen Zerfall des vorgewählten Mutterions entstehen (DADI = direct analysis of daughter ions ). Mit einem ESA-Scan erhält man somit ein Massenspektrum aller Tochterionen entweder des Molekülions oder irgendeines Bruchstückions der Masse $m_1$ (DADI-Spektrum). Die Massenskala ist gegeben durch :

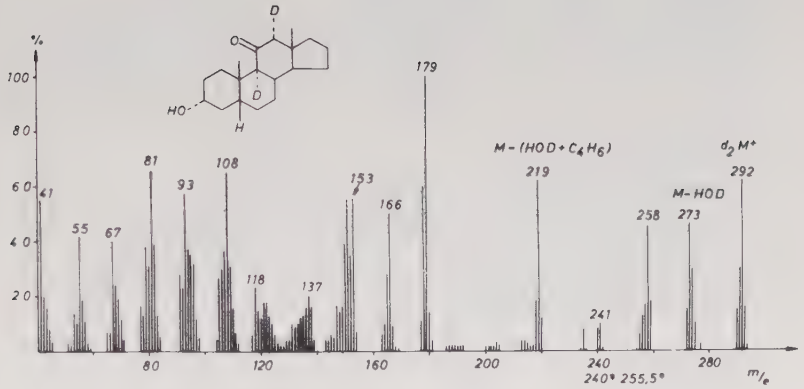
$$m_2 = m_1 \times E/E_o$$

## 2. Diskussion der Spektren zur Untersuchung des Mechanismus der Wasser- und Butadienabspaltung

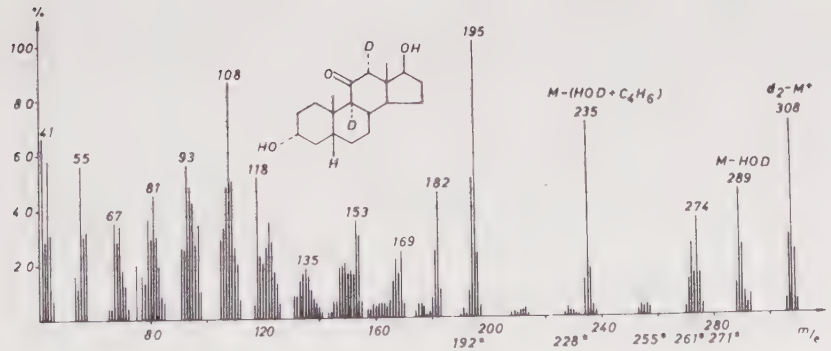
Auf der Grundlage von theoretischen Modellüberlegungen stellte ich für die elektronenstoßinduzierte Abspaltung von Wasser und Butadien bei 3α-Hydroxysteroiden mit cis-verknüpften A/B-Ringsystem und einer Carbonylgruppe in Position 11 einen Mechanismus auf (vgl. II , 3 S. 38) , wonach im ersten Schritt der Reaktion die 3α-Hydroxygruppe zusammen mit dem 9α-H-Atom eliminiert wird. Die zu dieser Annahme führenden Gründe wurden eingehend diskutiert (S. 36).

Für den experimentellen Beweis synthetisierte ich 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14) (vgl. S. 47 und S. 51) . Die Massenspektren dieser Verbindungen sind in Abbild. 15 und 16 abgebildet.

Im Massenspektrum von 13 (Abbild. 15) ist eindeutig zu erkennen, daß bei der elektronenstoßinduzierten Dehydratisierung statt




Abbild. 15 : Massenspektrum des 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-ons (13), Deuterierungsgrad : 15% $d_o$, 27% $d_1$, 56% $d_2$, 2% $d_3$.

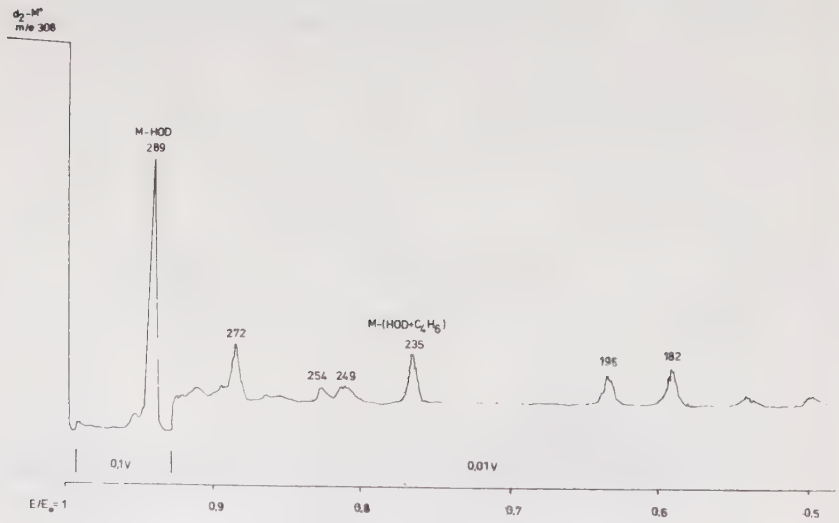



Abbild. 16 : Massenspektrum des 9α,12α,-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (14), Deuterierungsgrad : 5% $d_o$, 25% $d_1$, 60% $d_2$, 8% $d_3$, 2% $d_4$.

$H_2O$ bevorzugt HOD abgespalten wird.

Auch bei der Verbindung 14 (Abbild. 16) kann mit Hilfe des Massenspektrums die bevorzugte HOD-Abspaltung einwandfrei nachgewiesen werden, obwohl eine zweite OH-Gruppe (17ß-OH) vorhanden ist, die unter $H_2O$-Abspaltung eliminiert werden kann.

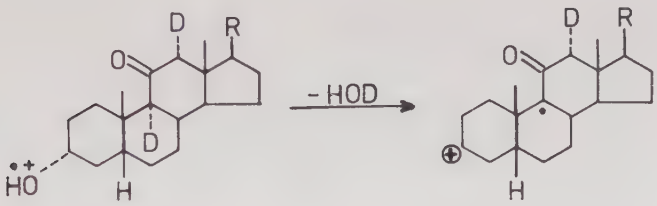
Aus dem DADI-Spektrum von 14 (Abbild. 17) geht hervor, daß der Hauptabbauprozeß der Molekülionen die Eliminierung von HOD ist. Die 17ß-Hydroxygruppe wird also erst in einem Folgeprozeß aus den M-HOD Ionen abgespalten.

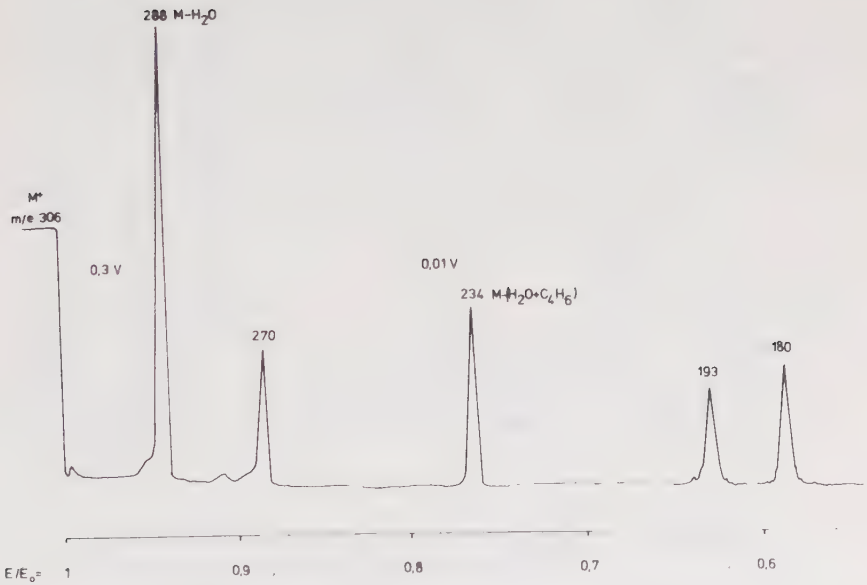



Abbild. 17: DADI-Spektrum vom Molekülion des 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (14)

Die Auswertung der Massenspektren der in Position 9 (zusätzlich auch in Stellung 12) deuterierten Verbindungen 13 und 14 bestätigt

also eindeutig, daß der erste Reaktionsschritt in Übereinstimmung mit dem aufgestellten Mechanismus für die Wasser- und Butadienabspaltung (vgl. S. 38) eine stereospezifische Eliminierung von Wasser bzw. HOD ist :

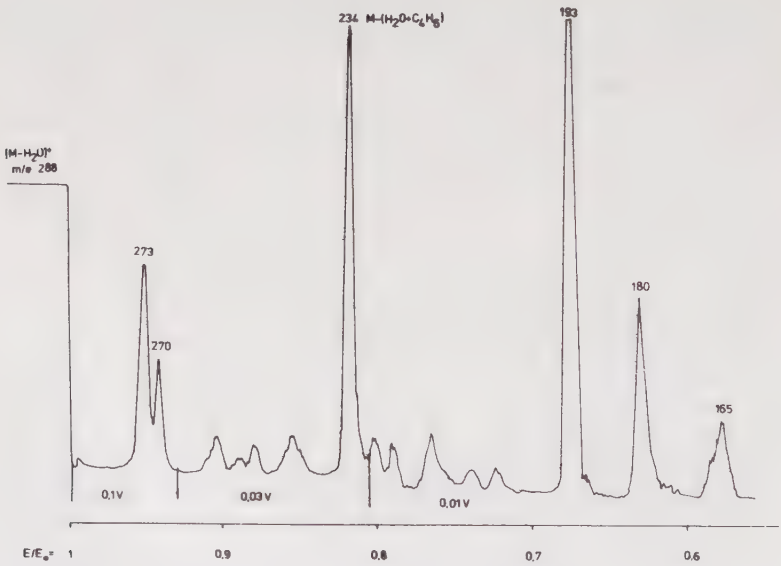



Abbild. 18 : DADI-Spektrum vom Molekülion des 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (11)

Weiterhin wurde postuliert, daß in einer Folgereaktion die C-Atome 1 bis 4 in Form von Butadien eliminiert werden und daß bei diesem Prozeß ein Wasserstoffatom von C-2 an das radikalische C-Atom 9 übertragen wird. Dieser Beweis wurde folgendermaßen geführt :

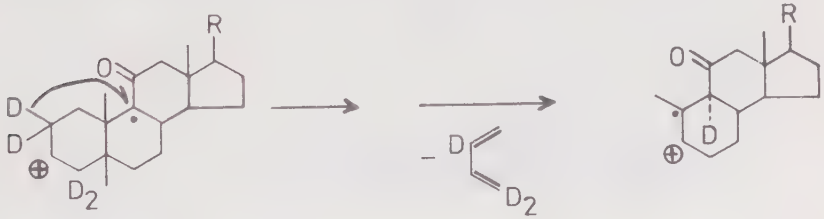
1) Um experimentell nachzuweisen, daß die M-72 ($H_2O + C_4H_6$) Ionen in einer Folgereaktion aus dem M-18 Ionen gebildet werden, wurde vom Molekülion und dem M-18 Ion des 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (11) jeweils ein Spektrum der Tochterionen mit Hilfe der DADI-Technik aufgenommen (Abbild. 18 und 19).

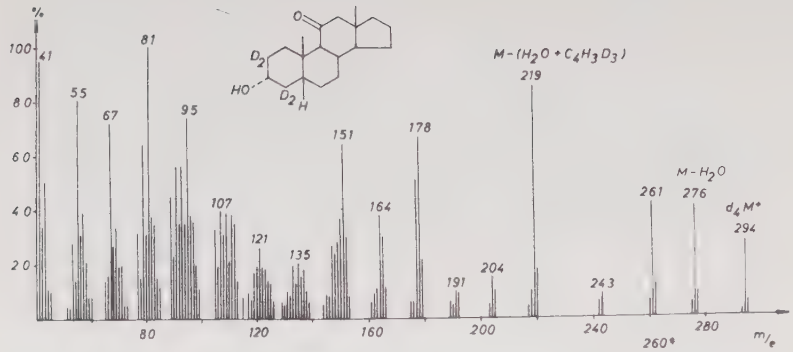



Abbild. 19 : DADI-Spektrum vom M-18 Fragment-Ion des 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (11).

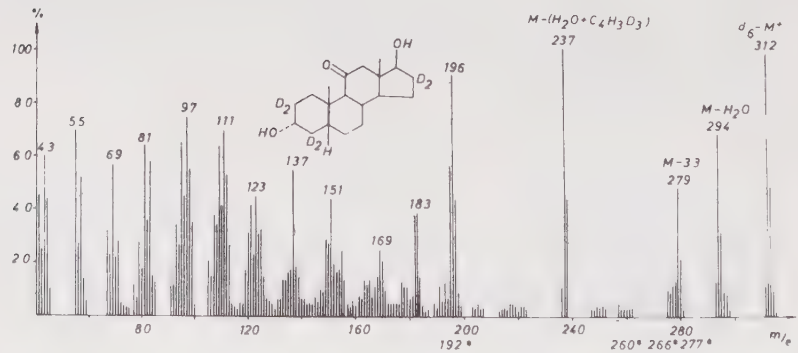
Ionen, die aus dem Molekülion von 11 durch Verlust von $H_2O$ und $C_4H_6$ entstehen, werden im Massenspektrum bei m/e 234 registriert. Wie das DADI-Spektrum der M-$H_2O$ Ionen von 11 zeigt (Abbild. 19), ist die Bildung der Ionen der Masse 234 der Hauptfragmentierungsvorgang der M-18 Ionen. Wenige Ionen werden auch direkt aus den Molekülionen gebildet (Abbild. 18).

Um zu beweisen, daß Butadien aus dem A-Ring abgespalten wird und dabei Wasserstoff von C-2 nach C-9 verschoben wird, wurden die Massenspektren von 2,2,4,4-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19) und 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) aufgenommen. In den Verbindungen 18 und 19 wurden die Wasserstoffatome in den Positionen 2 und 4 (in 18 zusätzlich in Position 16) durch Deuterium ausgetauscht. Würde die Eliminierung von $H_2O$ und $C_4H_6$ wie vorhergesagt (vgl. S. 38) ablaufen, so müßte bei der massenspektrometrischen Fragmentierung von 18 und 19 statt $C_4H_6$ $C_4H_3D_3$ (entsprechend einer Massendifferenz von 57 Masseneinheiten) aus dem M-$H_2O$ Bruchstück abgespalten werden. Die Massenspektren von 18 und 19 (Abbild. 20 und 21), bestätigen diese Erwartungen und somit die postulierte Reaktionsfolge (vgl. S. 38):



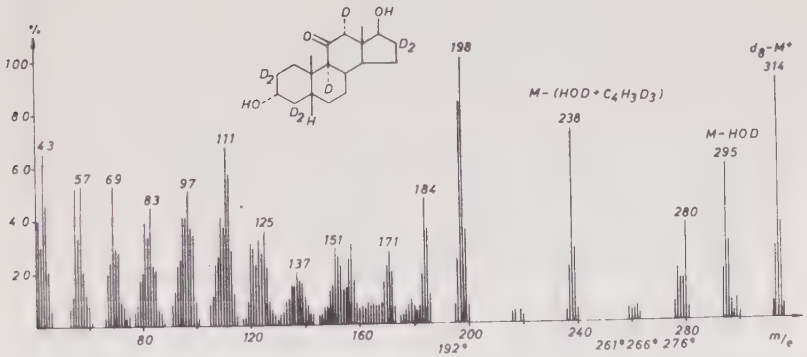



Abbild. 20 : Massenspektrum des 2,2,4,4-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-ons (19), Deuterierungsgrad : 7% $d_3$, 93% $d_4$.




Abbild. 21 : Massenspektrum des 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (18), Deuterierungsgrad : 5% $d_5$, 72% $d_6$, 20% $d_7$

Ergänzend wurde auch ein Massenspektrum von 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (16) aufgenommen (Abbild. 22). In 16 ist unter anderem sowohl das 9α-H-Atom als auch der Wasserstoff in Position 2 durch Deuterium ersetzt. Erwartungsgemäß wird erst HOD und in der Folge $C_4H_3D_3$ abgespalten.




Abbild. 22 : Massenspektrum des 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (16), Deuterierungsgrad : 5% $d_6$, 20% $d_7$, 62% $d_8$, 13% $d_9$.

## 3. Diskussion der Spektren zur Untersuchung des Mechanismus der Wasser- und Äthylenabspaltung

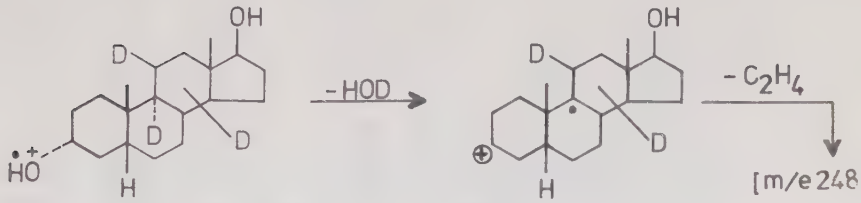
In den Massenspektren von A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxy-androstanen (Abbild. 13, S. 35) fällt im oberen Massenbereich neben den hohen M-18 Spitzen eine Schlüsseldifferenz von 46 Masseneinheiten auf (vgl. Abbild. 9 und 10, S. 33). Aus Hochauflösungsdaten ist ableitbar, daß diese Massendifferenz einem Verlust von $H_2O$ und $C_2H_4$ aus dem Molekülion entspricht.

Da auch diese Verbindungen das Strukturelement 1 (vgl. S. 2) enthalten und somit ein für die Wasserabspaltung günstigen Abstand zwischen der 3α-OH-Gruppe und dem 9α-H-Atom eingenommen werden kann, wurde vorhergesagt (vgl. den Mechanismus auf S. 41), daß auch in diesem Falle (wie in A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxy-steroiden mit einer 11-Ketogruppe) die 3α-OH-Gruppe mit dem 9α-H-Atom unter Bildung eines analogen M-18 Ions abgespalten wird.

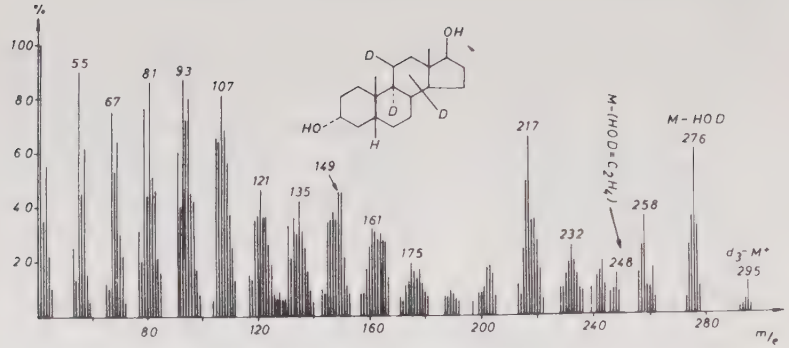
Als Modellverbindung für die mechanistische Untersuchung der Abspaltung von $H_2O$ und $C_2H_4$ wählte ich das 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (20). Zum Beweis der postulierten $H_2O$-Abspaltung mußte auch in 20 das 9α-H-Atom gegen Deuterium ausgetauscht werden.

In diesem Falle konnte das nicht durch säurekatalytischen Austausch erfolgen, weil in 20 keine 11-Ketogruppe vorhanden ist. Ich deuterierte deswegen die 9,11-Doppelbindung im 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) katalytisch mit Deuteriumgas. Trotz des ungünstigen Isotopenverhältnisses (die Position des zusätzlich eingeführten D-Atoms kann nicht sicher angegeben werden) ist in dem Massenspektrum der so erhaltenen deuterierten Verbindung (24) eine HOD-Abspaltung noch deutlich zu erkennen (Abbild. 23). Auch die charakteristische Massendifferenz von 46 Masseneinheiten wurde

dementsprechend zu einer Schlüsseldifferenz von 47 (HOD + $C_2H_4$) Masseneinheiten (m/e 248) verschoben (Abbild. 23 ).

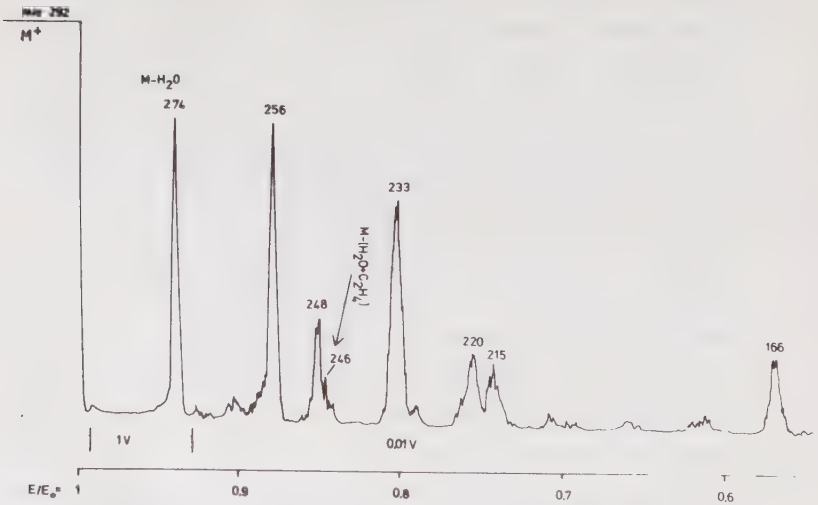



Mit den DADI-Spektren (Abbild. 24 und 25) des undeuterierten 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstans (20) soll die Reaktionsfolge, Abspaltung von Wasser aus dem Molekülion (Abbild. 24) und anschließende Eliminierung von $C_2H_4$ aus dem M-18 Fragment (Abbild. 25), bewiesen werden. Wie die Spektren zeigen, sind die Abspaltungen von einem und zwei Molekülen Wasser die Hauptfragmentierungsprozesse des Molekülions von 20 (Abbild. 24). M-($H_2O$ + $C_2H_4$) Ionen werden nahezu ausschließlich aus den M-$H_2O$ Ionen gebildet (Abbild. 25 und 24). Die vorhergesagte Reaktionsfolge wird also durch die DADI-Spektren (Abbild. 24 und 25) eindeutig belegt.

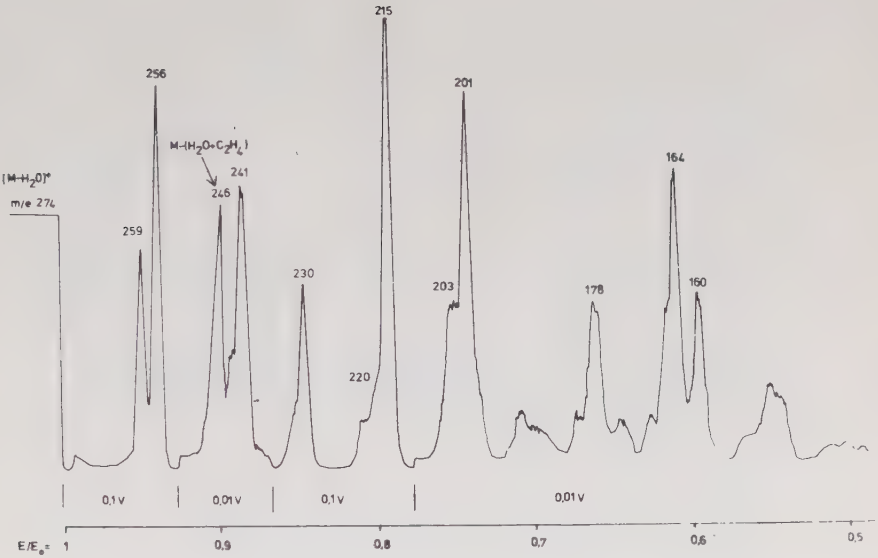



Abbild. 23 : Massenspektrum des 9α,11,X-$d_3$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstans (24) ;

Dieses Spektrum wurde mit der Kopplung Aerograph 1700/CH 7-Massenspektrometer aufgenommen.




Abbild. 24 : DADI-Spektrum vom Molekülion des 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstans (20).




Abbild.25 : DADI-Spektrum vom M-$H_2O$ Ion des 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstans (20).

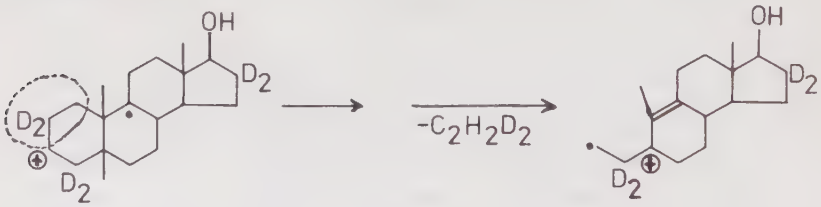
Beim Vergleich der beiden DADI-Spektren (Abbild. 24 und 25) ist klar ersichtlich, daß die meisten Fragmentierungsprozesse nicht von den Molekülionen, sondern von den M-18 Ionen ausgehen. Lediglich die Ionen der Masse 248 und 233, die aus dem Abbau des D-Ringes unter Verlust von C-15 bis C-17 hervorgehen, entstehen direkt aus den Molekülionen.

Um die Vermutung (vgl. S. 41) zu bestätigen, daß die C-Atome 1 und 2 des Steroidgerüstes als Äthylen eliminiert werden, markierte ich im 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (20) die Position 2 (aus synthesetechnischen Gründen zusätzlich die Positionen 4 und 16 ) mit Deuterium.

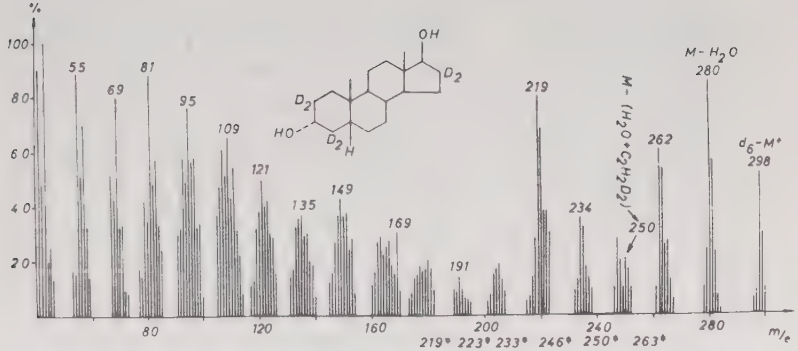
Aus den Molekülionen von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) müßte nach der Vorhersage (S. 41) statt Wasser und Äthylen Wasser und $C_2H_2D_2$ abgespalten werden. Im Massenspektrum von 22 müßte dann die Schlüsseldifferenz von 46 Masseneinheiten (ME) auf 48 ME verschoben werden.

Erwartungsgemäß wird die postulierte Fragmentierung (vgl. S. 41) von 22 im Massenspektrum (Abbild. 26) durch Ionen der Masse 250 (298 - 48) angezeigt.

Mit Hilfe der Hochauflösungstechnik läßt sich aus der exakten Masse der Ionen die Bruttoformel $C_{17}H_{22}D_4O$ berechnen. Die Bruttoformel des Molekülions ist $C_{19}H_{26}D_6O_2$. Damit ist die Abspaltung von $H_2O$ und $C_2H_2D_2$ aus dem Molekülion von 22 bewiesen und gleichzeitig der aufgestellte Mechanismus (vgl. S. 41), wonach C-1 und C-2 als Äthylen abgespalten werden, bestätigt :




Das Ion der Masse 251 hat die Bruttoformel $C_{17}H_{21}D_5O$ (ermittelt mit der Hochauflösungstechnik). Die Bildung läßt sich als Abspaltung von $H_2O$ und $C_2H_2D_2$ aus dem $d_7$-Isotop des Molekülions interpretieren.

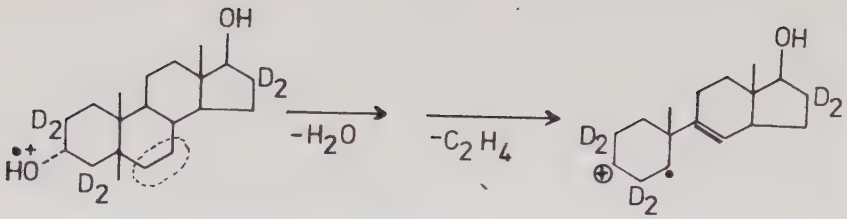



Abbild. 26 : Massenspektrum des 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstans (22),

Deuterierungsgrad : 7% $d_4$, 8% $d_5$, 60% $d_6$, 20% $d_7$, 5% $d_8$.

Den nur mit geringer Intensität auftretenden Ionen der Masse 252 kommt eine Bruttoformel von $C_{17}H_{20}D_6O$ zu, was einem Verlust von $H_2O$ und $C_2H_4$ (46 ME) aus dem $d_6$-Isotop des Molekülions entspricht. Aus diesem Befund läßt sich ableiten, daß Äthylen nicht nur aus den Positionen 1 und 2, sondern in geringem Maße auch aus anderen Positionen des Steroidgerüstes eliminiert werden kann.

Eine Alternative zur Abspaltung von C-1 und C-2 als Äthylen, ist die Abspaltung von C-6 und C-7 als $C_2H_4$. Diese Möglichkeit wurde ebenfalls aus den mechanistischen Überlegungen (vgl. S. 42) abgeleitet :


OH
D2
D2
HO
D2
-H2O
-C2H4
OH
D2
D2
D2

## C ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel des ersten Teils meiner Arbeit war, durch Modellbetrachtungen von Monohydroxysteroiden mögliche Mechanismen der elektronenstoßinduzierten Wassereliminierung abzuleiten und durch Vergleich mit Spektren bekannter Verbindungen zu belegen. Dazu untersuchte ich in der Literatur und in unserer Spektrenkartei dokumentierte Massenspektren von Hydroxysteroiden auf das Dehydratisierungsverhalten.

Meine Studien führten zu folgendem Ergebnis :
Bei Hydroxysteroiden, bei denen für die $H_2O$-Abspaltung eine 1,4-Eliminierungsreaktion postuliert werden kann, ist die Tendenz zur Dehydratisierung weit höher als bei Hydroxysteroiden, bei denen eine 1,3-Eliminierung ableitbar ist. Dieses Verhalten kann mit dem unterschiedlichen HO--H-Abstand erklärt werden, der bei einer 1,4-Eliminierung in der Regel 1,8 Å , bei einer diaxialen 1,3-Eliminierung dagegen 2,5 Å beträgt.

Neben diesen bisher hauptsächlich an Cyclohexanolderivaten untersuchten Mechanismen der Wasserabspaltung , für die in Hydroxysteroiden nur die Wasserstoffatome des gleichen Ringes in Frage kommen, wurden auch solche Eliminierungsmöglichkeiten berücksichtigt, die unter Beteiligung von H-Atomen aus benachbarten Ringen erfolgen können. In Übereinstimmung mit vergleichbaren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, kam ich zu dem Schluß, daß der aus dem Molekül abschätzbare, für eine Wassereliminierung günstige Abstand von Hydroxylgruppe und Wasserstoffatom etwa zwischen 1,1 und 2,5 Å liegt.

Durch Variieren der Ringkonformation sind in Dreiding-Modellen von Hydroxysteroiden teilweise HO--H-Abstände konstruierbar, die

kleiner als 1 Å sind. Diese zunächst für die Wasserabspaltung besonders günstig erscheinenden Konformationen sind jedoch wegen der aufzuwendenden hohen Energie bei der Annäherung der Atome nicht realisierbar.

Bei Modellbetrachtungen zur Ableitung von Eliminierungsmöglichkeiten muß weiterhin berücksichtigt werden, daß die Wahrscheinlichkeit der Abspaltung von Wasserstoffatomen in Hydroxysteroiden, je nach der Dissoziationsenergie der C-H-Bindung, sehr unterschiedlich ist. Besonders leicht wird aus folgenden Positionen des Steroidgerüstes Wasserstoff abgespalten :

1) Wasserstoffatome der tertiären C-Atome 5, 8, 9 und 14
2) Wasserstoffatome von Carbinol-C-Atomen
3) Wasserstoffatome, die durch eine benachbarte Carbonylgruppe aktiviert sind.

Läßt sich am Modell ableiten, daß Wasserstoffatome aus diesen Positionen mit der Hydroxylgruppe eliminiert werden können, so ist die Dehydratisierungstendenz (vorausgesetzt, daß analoge Eliminierungsmechanismen verglichen werden) höher als bei Wasserabspaltungen, bei denen Wasserstoffatome an sekundären C-Atomen beteiligt würden.

Das aus Modellüberlegungen abschätzbare Dehydratisierungsverhalten ist somit abhängig von der Art des Mechanismus der Wasserabspaltung und der Natur der C-H-Bindung der Wasserstoffatome, die zusammen mit der OH-Gruppe abgespalten werden.

Auf der Grundlage dieser Aussage wurde versucht, Hydroxysteroide je nach ihrer zu erwartenden $H_2O$-Eliminierungstendenz in zwei Gruppen einzuteilen.
Aus dieser Einteilung ist zu entnehmen, bei welchen Hydroxy-

steroiden überhaupt ein konfigurationsbedingter Unterschied in der Dehydratisierungstendenz zu erwarten ist.

So sollten z. B. bei A/B-trans-verknüpften 2-Hydroxysteroiden auf Grund des vorhersagbaren unterschiedlichen Dehydratisierungsverhaltens die Konfiguration der Hydroxylgruppe allein aus dem Massenspektrum abzuleiten sein. Systematische Untersuchungen der Massenspektren von 2-Hydroxysteroiden wurden bisher nicht durchgeführt.

Bei 7- und 11-Hydroxysteroiden sind die auf der Grundlage des angegebenen Einteilungsprinzips getroffenen Aussagen völlig unzutreffend. Sowohl in 7- als auch in 11-Hydroxysteroiden ist die OH-Gruppe an ein C-Atom gebunden, das benachbart zu einem Brückenkopf-C-Atom steht. Es muß angenommen werden, daß dadurch die Ringstabilität soweit herabgesetzt wird, daß die Wassereliminierung nicht aus dem intakten Ringsystem, sondern erst nach Spaltung einer C-C-Ringbindung erfolgt, wodurch der stereochemisch kontrollierte Verlauf der Eliminierungsreaktion aufgehoben wird.

Bei 3-Hydroxysteroiden konnte ich auf eine umfangreiche Sammlung von Massenspektren zurückgreifen und deshalb das Fragmentierungsverhalten dieser Substanzklasse systematisch untersuchen. Dabei ergab sich, daß nur in A/B-cis-verknüpften 3$\alpha$-Hydroxysteroiden eine außerordentlich hohe Neigung zur Wassereliminierung zu beobachten ist.

In 3$\alpha$-Hydroxysteroiden, in denen das A/B-Ringsystem cis-verknüpft ist und die in Position 11 eine Carbonylgruppe tragen, fallen im Massenspektrum zusätzlich Ionen hoher Intensität auf, die einem Verlust von 72 Masseneinheiten aus dem Molekülion entsprechen.

Diese Bruchstückbildung hat für die Strukturuntersuchung von Steroiden außerordentliche Bedeutung, weil aus dem Auftreten dieser Schlüsselionen die Verknüpfung des A/B-Ringsystems und die Konfiguration der 3-Hydroxygruppe eindeutig bestimmt werden kann. Deswegen wurde der Mechanismus dieser Fragmentierungsreaktion eingehend untersucht.

In A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxy-androstanen, in denen die 11-Ketogruppe fehlt, wird dieser Spaltungsprozeß sehr stark zurückgedrängt. Für diese Verbindungsklasse ist aber neben den hohen M-$H_2O$ Spitzen eine Schlüsseldifferenz von 46 Masseneinheiten außerordentlich charakteristisch.

Auf der Grundlage der Modellüberlegungen wurden für die Bildung der M-72 und M-46 Ionen Fragmentierungsmechanismen postuliert, anschließend entsprechende dueterierte A/B-cis-verknüpfte 3α-Hydroxysteroide synthetisiert und deren Massenspektren aufgenommen.

Die Massenverschiebungen in den Massenspektren der deuterierten Verbindungen entsprach vollständig den Erwartungen. Damit wurden die aufgestellten Mechanismen bestätigt :

Bei A/B-cis-verknüpften 3α-Hydroxysteroiden mit einer 11-Ketogruppe wird zunächst die 3α-OH-Gruppe zusammen mit dem 9α-H-Atom eliminiert. (Der Abstand zwischen der 3α-OH-Gruppe und dem 9α-H-Atom beträgt, wenn der A-Ring in der Wannenform vorliegt, im Modell 1,1 Å ). In der Folge wird ein H-Atom

aus der Position 2 an das radikalische C-Atom 9 übertragen und dadurch die Abspaltung der C-Atome 1 bis 4 als Butadien ermöglicht.

Fehlt in A/B-cis-verknüpften 3$\alpha$-Hydroxy-androstanen die Ketogruppe in Stellung 11, wird zunächst ein analoges M-$H_2O$ Bruchstück gebildet, dann werden aber in einer Folgereaktion die C-Atome 1 und 2 als Äthylen eliminiert. In geringem Maße wird Äthylen auch aus anderen Positionen des Steroidgerüstes (wahrscheinlich aus 6 und 7) abgespalten.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### 1. Allgemeines

#### a) Aufnahme der Massenspektren

Die in der Arbeit abgebildeten Massenspektren wurden, falls nicht anders vermerkt, mit einem Varian-MAT CH 4-Massenspektrometer, versehen mit einer E-4B Ionenquelle, durch direkte Einführung der Probe in die Ionenquelle aufgenommen. Die Elektronenstoßenergie betrug 70 eV, die Ionenquellentemperatur wurde zwischen 100 und 110°C gehalten. Die Proben wurden zwischen 100 und 120° verdampft.

Die Bruttoformeln von Molekül- und Fragment-Ionen wurden mit einem doppelfokussierenden SM 1B Massenspektrometer der Fa. Varian-MAT, Bremen, bestimmt.

Zur Ermittlung der Zusammensetzung von Reaktionsprodukten und zur Aufnahme der Massenspektren von kleinen Probenmengen, die dünnschichtchromatographisch nicht mehr gereinigt werden konnten, wurde ein Gaschromatograph (Aerograph 1700), der mit einem CH 7 Massenspektrometer über einen zweistufigen Biemann-Watson-Separator der Fa. Varian-MAT, Bremen, gekoppelt ist, verwendet. Die Injektortemperatur betrug 250°, die der Ionenquelle 150°. Die Ionisierung erfolgte bei 70 eV. Der Gaschromatograph war mit einer 1,5 m langen, gepackten Glassäule (Chromosorb W-AW-DMCS 80-100 mesh, belegt mit 3% SE 30) ausgestattet.

#### b) Messung der DADI-Spektren

Die DADI-Spektren wurden mit einem doppelfokussierenden MAT 311-Massenspektrometer der Fa. Varian-MAT gemessen. Die Ionenquellentemperatur betrug dabei 250°, die Ionisierung erfolgte ebenfalls bei einer Elektronenstoßenergie von 70 eV.

c) Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel HR der Fa. Merck verwendet, das mit einem Streichgerät (Fa. Desaga, Modell 611) in 0,75 mm dicker Schicht auf Glasplatten (20 x 20 cm) aufgetragen wurde.
Zum Anfärben diente eine Anisaldehyd-Schwefelsäure-Mischung in Eisessig.

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Block bestimmt und sind unkorrigiert.

2. Beschreibung der Versuche

a) Synthese von 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8)

Oxydativer Abbau der Cortison-Seitenkette :

In einem 1 ltr-Dreihalskolben, versehen mit einem KPG-Rührer, wurden 5 g (13,9 mmol) Cortison zunächst in 230 ml Eisessig gelöst und diese Lösung dann mit 230 ml destilliertem Wasser verdünnt. Dazu wurden 67,8 g (0,24 Mol) Natriumbismutat gegeben und das gesamte Reaktionsgemisch 30 Stdn. kräftig gerührt [35]. Nachdem sich die anorganischen Salze abgesetzt hatten, wurde die überstehende Lösung abdekantiert, mit 350 ml Wasser verdünnt und fünfmal mit etwa 100 bis 200 ml Äther extrahiert. Der Rückstand wurde durch mehrmaliges Aufschlämmen in Äther und Aceton extrahiert. Die beiden Extraktionslösungen wurden vereinigt, mit Natriumkarbonatlösung neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Die Rohausbeute betrug 3,4 g (85% d. Th.). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton wurden 2,8 g (70% d. Th.) 4-Androsten-3,11,17-trion (28) isoliert ; Schmp. 224-226° (Lit. Schmp. 224°) [35].

Katalytische Hydrierung des 4-Androsten-3,11,17-trions :

a) Hydrierung in N, N-Dimethylformamid : 300 mg 4-Androsten-3,11,17-trion (28) wurden in 15 ml N, N-Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe von 30 mg Palladium-Katalysator (10% Palladium auf Calciumkarbonat) 6 Stdn. bei Normaldruck und Raumtemp. hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators wurde in 80 ml Äther aufgenommen und mit insgesamt 50 ml Wasser unter Zusatz von etwas verdünnter Salzsäure fünfmal gewaschen. Es wurde einmal mit einer Natriumhydrogenkarbonatlösung nachgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeengt. Durch Aufnahme eines Massenspektrums des Rohproduktes und analytische Dünnschichtchromatographie (Laufmittel : Äther) konnte nachgewiesen werden, daß die Hydrierung vollständig verlaufen war.

Das gesamte Rohprodukt wurde anschließend durch Stufen-Chromatographie an Kieselgel-Dünnschichtplatten getrennt.

Laufmittel : a) Chloroform/Äther 1 : 1
b) Chloroform/Äther 1 : 1
c) Äther, 0,5% Äthylalkohol
d) Äther, 0,5% Äthylalkohol

Entwicklung : a) $R_F$-Wert 0,7 (gelb)
100 mg (33% d. Th.) 5α-Androstan-3,11,17-trion (9)
Schmp. 173-175°
b) $R_F$-Wert 0,55 (rotbraun)
120 mg öliges Produkt (5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) verunreinigt mit 9

Die 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) enthaltende untere Zone wurde noch einmal der Dünnschichtchromatographie unterworfen.

Laufmittel : a) Chloroform/Äther 1 :1
b) Chloroform/Äther 1 :1 und 0,5% Äthylalkohol
c) Chloroform/Äther 1 :1 und 1% Äthylalkohol

Entwicklung: a) $R_F$-Wert 0,7 (gelb)
45 mg (15% d. Th.) 9
b) $R_F$-Wert 0,6 (rotbraun)
36 mg (12% d. Th.) 8
Schmp. 120-125° (Äther/Hexan) (Lit. Schmp. 132-134°) [44]

b) Hydrierung in Methanol :

2 g (6,7 mMol) 4-Androsten-3,11,17-trion (28) wurden in 60 ml Methanol gelöst und 200 mg Palladium-Katalysator (10% Palladium auf Calciumkarbonat) hinzugefügt. Es wurde 3 Stdn. bei Raumtemp. und Normaldruck hydriert. Die Wasserstoffaufnahme war bereits nach 2 Stdn. beendet ; es wurden 160 ml Wasserstoff (Theoretischer Verbrauch : 150 ml bei Normalbedingungen) aufgenommen. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und die methanolische Lösung zur Trockene eingeengt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie überprüft. Nach präparativer dünnschichtchromatographischer Trennung wurden wie zuvor beschrieben 1250 mg (62% d. Th.) 5α-Androstan-3,11,17-trion (9)(Schmp. 172-175°) und 465 mg (23% d. Th.) 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) (Schmp. 121-127°, Äther, Cyclohexan) isoliert.

b) Allgemeine Vorschrift für den säurekatalysierten Austausch von enolisierbaren H-Atomen gegen Deuterium

Ansatz für etwa 100 mg Ketosteroid : Zu 200 mg Deuteriumoxid gibt man portionsweise 50 mg Phosphor(V)-chlorid. Nach kurzem Stehenlassen dieser Mischung unter Stickstoff verdünnt man mit 200 mg Deuteriumoxid. 100 mg des Ketosteroids werden in 3-5 ml Mono-

deuteromethanol gelöst und hinzugefügt. Die gesamte Reaktionslösung wird nun 10 bis 30 Stdn. unter Rückfluß erhitzt [40].

Bevor man zur Isolierung der deuterierten Verbindung mit Wasser verdünnt, muß zuerst mit Pyridin neutralisiert werden. Besser ist es, mit Deuteriumoxid zu verdünnen und dann mit Äther zu extrahieren. Zur Erhöhung des Deuterierungsgrades ist es oft vorteilhaft, die Austauschreaktion zu wiederholen.

Ansatz für 1-5 mg Ketosteroid :

1 Spatelspitze (ca. 5 mg) Phosphor(V)-chlorid wird in einem kleinen Spitzkolben vorgegeben und dann mit 50-100 µl $D_2O$ versetzt (Ablaufenlassen am Kolbenrand, unter $N_2$-Atmosphäre arbeiten). Das Ketosteroid wird in 1-2 ml Monodeuteromethanol gelöst und zugefügt. Die Reaktionslösung wird mindestens 20 Stdn. gelinde unter Rückfluß erhitzt. Man verdünnt dann wie oben beschrieben mit Deuteriumoxid und extrahiert mit Äther oder Methylenchlorid.

c) Versuche zur partiellen Reduktion der 3-Ketogruppe in Androstan-3,11,17-trionen

Reduktion von 5α-Androstan-3,11,17-trion (9) mit $NaBH_4$ in Methanol :

130 mg (0,43 mMol) 9 wurden in 40 ml Methanol gelöst und unter Eiswasserkühlung auf 0°C abgekühlt. Dazu wurde eine Lösung aus 6,7 mg (0,17 mMol) $NaBH_4$, 0,2 ml Wasser und 0,8 ml Methanol getropft. Nach 20 min Reaktionszeit, währenddessen die Lösung mit einem Magnetrührer gerührt wurde, wurden 80 ml Wasser zugesetzt und mehrmals mit Äther extrahiert. Nach Trocknen und Abdampfen des Äthers erhielt ich 125 mg kristallines Rohprodukt. Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung dieses Produktes wurden

folgende Produkte erhalten :

Laufmittel : a) Chloroform/Äther 1 : 1 und 3% Äthylalkohol
b) Äther, 3% Äthylalkohol

Entwicklung: a) $R_F$-Wert 0,4 (blau)
64 mg 3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan-11-on (25) (49% d. Th.)

b) $R_F$-Wert 0,6 (blau)
24 mg 3ß-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion (29) (19% d. Th.)

Reduktion von 9 mit $Ca(BH_4)_2$ [39]:

Zu einer auf -25°C abgekühlten Lösung von 2 mg $CaCl_2$ (0,0885 mMol) in 2 ml Äthylalkohol wurden unter Rühren 6 mg (0,15 mMol) 95 proz. $NaBH_4$ in 15 ml Äthylalkohol gegeben. Es bildete sich Natriumchlorid das die Lösung schwach trübte. Nach 15 min wurde eine Lösung von 105 mg (0,345 mMol) 9 in 5 ml Äthylalkohol innerhalb von 5 min zugetropft.
Es wurde noch 90 min bei -20°C gerührt und dann die Reaktion durch Zugabe einer Mischung von 0,1 ml Eisessig und 0,2 ml Wasser abgestoppt. Dann wurde die gesamte Reaktionslösung zur Trockene eingedampft, in Äther aufgenommen und die Ätherlösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen. Der Äther wurde nach Trocknen über Natriumsulfat am Rotationsverdampfer verflüchtigt. Zur dünnschichtchromatographischen Trennung des Rohproduktes wurde folgendes Laufmittelsystem verwendet :

a) Äther/Chloroform 1 : 1 versetzt mit 3% Äthylalkohol
b) Äther/Chloroform 1 : 1 versetzt mit 3% Äthylalkohol
c) Äther 3% Äthylalkohol

Entwicklung : a) $R_F$-Wert 0,6 (blau)
40 mg (38% d. Th.) 3ß-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion (30)

b) $R_F$-Wert 0,7 (gelb) 18 mg (17%)
Ausgangsverbindung 9

Die Identifizierung wurde massenspektrometrisch mit Hilfe von Vergleichspektren vorgenommen [12].

Reduktion von 5ß-Androstan-3,11,17-trion (8) mit $Ca(BH_4)_2$ [39]

29 mg 0,254 mMol) $CaCl_2$ in 6 ml Äthylalkohol wurden auf -25°C abgekühlt und unter Rühren 17,2 mg (0,43 mMol) 95 proz. $NaBH_4$ in 4,5 ml Äthylalkohol zugegeben. Nach 15 min wurde eine Lösung von 300 mg (1 mMol) 8 in 15 ml Äthylakohol tropfenweise hinzugefügt. Nach 2,5 Stdn. wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure (0,3 ml Eisessig, 0,6 ml Wasser) abgebrochen und das Produkt, wie zuvor bei der Reduktion von 9 beschrieben, isoliert.
Dünnschichtchromatographische Reinigung :

Laufmittel : Äther, 3% Äthylalkohol

Entwicklung : a) $R_F$-Wert 0,45 (braunrot) 60 mg (20%)
Ausgangsverbindung 8

b) $R_F$-Wert 0,35 (blau) 121 mg (40% d. Th.)
3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion (10)
Schmp. 185-188°

c) $R_F$-Wert ca. 0,2 (blau) geringe Mengen
3,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-one

d) Synthese von 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (13) und 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (14)

Reduktion von 8 mit $(CaBH_4)_2$ [39]:

100 mg $CaCl_2$ in 25 ml Äthylalkohol wurden mit einer Trockeneis/Aceton-Kühlung auf -25°C abgekühlt und 60 mg (1,6 mMol) $NaBH_4$ in 20 ml Äthylalkohol zugegeben. Nach 15 Min. wurde tropfenweise unter Rühren 750 mg (2,5 mMol) 8 in 30 ml Äthylalkohol innerhalb von 40 Min. hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde dabei zwischen -25 und -20°C gehalten und 4 Stdn. bei dieser Temperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Da nach zwei Stunden noch relativ viel Ausgangsverbindung im Reaktionsgemisch nachweisbar war, wurden noch etwa 10-15 mg $NaBH_4$ zugesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie zuvor beschrieben, wobei 310 mg (40% d. Th.) 3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion (10), Schmp. 184-186°, und 250 mg (33% d. Th.) 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (11), Schmp. 229-231°, isoliert wurden.

Huang-Minlon-Reduktion von 10:

250 mg (0,82 mMol) 10 wurden in einer Mischung von 5 ml Triäthylenglycol, 2 ml n-Butanol und 1 ml 85 proz. Hydrazinhydrat 2 Stdn. unter Rückfluß gesiedet. Dann wurde kurz abgekühlt und 400 mg NaOH hinzugegeben. Der Rückflußkühler wurde gegen eine Destillationsbrücke ausgetauscht und nun die leichtsiedenden Anteile solange aus dem Reaktionsgemisch verdampft, bis die Innentemperatur auf 200° gestiegen war. Das Reaktionsgemisch wurde dann 3 Stdn. zwischen 200 und 210° gehalten. Nach dem Abkühlen wurde der Kolbeninhalt auf Eis gegossen, mit wenig verdünnter Salzsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Die

Ätherphase wurde mit Natriumkarbonatlösung neutralgewaschen und der Äther nach dem Trocknen über Natriumsulfat abdestilliert (Rohausbeute : 200 mg braunes Öl). Das Rohprodukt wurde dünnschichtchromatographisch gereinigt.

Laufmittel : a) Chloroform/Äther 85 : 10 und 1% Äthylen
b) Chloroform/Äther 70 : 30 und 1,5% Äthylalkohol

In dem so erhaltenen 3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (12) und in 11 wurden die H-Atome in den Positionen 9 und 12 säurekatalytisch gegen Deuterium ausgetauscht (Arbeitsvorschrift Seite 85).
Massenspektrum des 9α,12α-$d_2$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-ons (13) siehe Seite 63

Massenspektrum des 9α,12α-$d_2$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-ons (14) siehe Seite 63

e) Darstellung von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) und 2,2,4,4,-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-on (19)

Natriumborhydrid-Reduktion von 15 [45]:

Zu einer Lösung von 6 mg (0,13 mMol) 80 proz. $NaBH_4$ in 0,15 ml Wasser und 0,75 ml Methanol wurde eine Lösung von 130 mg 15 in 3 ml Methanol unter Rühren bei Raumtemperatur zugetropft. Nach 20 Min. wurde das Reaktionsgemisch in der üblichen Weise aufgearbeitet. Die Rohausbeute betrug 120 mg (92% d. Th.). Das Reaktionsgemisch wurde dünnschichtchromatographisch in folgenden Laufmittelsystemen getrennt :

a) Chloroform
b) 60 ml Äther, 40 ml Chloroform, 1 ml Methanol
c) 80 ml Äther, 20 ml Chloroform, 1 ml Methanol
d) 90 ml Äther, 10 ml Chloroform, 2 ml Methanol
e) 100 ml Äther, 5 ml Methanol

Entwicklung : a) $R_F$-Wert 0,4 (blau) 10 mg (8% d. Th. ) 2,2,4,4, 9α,12α,16,16-$d_8$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion (17)

b) $R_F$-Wert 0,27 (blau) 6 mg (5% d. Th. ) 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3ß,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (26)

c) $R_F$-Wert 0,20 (blau) 65 mg (50% d. Th. ) 2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (16) Schmp. 240-245°.

16 und 17 wurden zur weiteren Reinigung noch einmal im gleichen Laufsystem an Dünnschichtplatten chromatographiert :
Ausbeuten : 40 mg (62% d. Th. ) 16 Schmp. 245-248° (Aceton).
5 mg 17 Schmp. 182-186° (Äther/Aceton).

2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (18) :

37 mg 16 wurden in 10 ml Methanol gelöst und unter Zugabe von 1 ml konz. Salzsäure 30 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurden 20 ml Wasser zugegeben, mit Natriumchlorid gesättigt und die wäßrige Phase mit Äther extrahiert. Aus der Ätherlösung wurden 32 mg 18 isoliert.
Deuterierungsgrad : 5% $d_5$ , 72% $d_6$ . 20 % $d_7$

(Massenspektrum siehe Seite 68 ).

Huang-Minlon -Reduktion von 17

5 mg 17 wurden mit 4 ml Triglycol, 2 ml n-Butanol und 2 ml 95 proz. Hydrazinhydrat versetzt und 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde etwas abgekühlt und mit 200 mg KOH versetzt. Der Rückflußkühler wurde dann gegen eine Destillationsbrücke ausgetauscht und die leichtsiedenden Anteile solange abdestilliert, bis im Reaktionskolben eine Innentemperatur von 200° erreicht war. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch noch 4 Stdn. bei einer Temperatur von etwa 210° gehalten.
Nach üblicher Aufarbeitung wurden 2 mg unsauberes Produkt isoliert . Das Massenspektrum des darin enthaltenen 2,2,4,4-$d_4$-3α-Hydroxy-5ß-androstan-11-ons (19) wurde mit der Kombination Gaschromatograph/Massenspektrometer aufgenommen (vgl. Abbild. 20).

f) Darstellung von 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) :

2,2,4,4,9α,12α,16,16-$d_8$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on[46]:

170 mg (0,55 mMol) 15 (Darstellung vgl. S. 85) wurden in 10 ml Methanol gelöst und unter Rühren zu einer Lösung von 420 mg (11 mMol = 10facher Überschuß) $NaBH_4$ in 8 ml $H_2O$ und 40 ml Methanol getropft. Anschließend wurde die gesamte Reaktionslösung 2,5 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. In Abständen von 30 Min. wurde der Reaktionsverlauf durch analytische Dünnschichtchromatographie (Laufmittel : Äther, 1,5% Äthylalkohol) des Reaktionsgemisches kontrolliert.

Nach 2,5 Stdn. konnte dünnschichtchromatographisch keine Ausgangsverbindung mehr nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Dünnschichtplatte brachte folgendes Resultat :

$R_F$-Wert 0,165 (lila, wenig); $R_F$-Wert 0,11 (blau, Hauptmenge).

Aufarbeitung : Zur methanolischen Reaktionslösung wurden 100 ml Wasser gegeben, die wäßrige Phase mit NaCl gesättigt und mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde zweimal mit wenig Wasser nachgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt.
Rohausbeute : 125 mg (75% d.Th.).

Dieses Produkt wurde ohne vorherige Reinigung in 50 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 5 ml konz. Salzsäure 10 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 90 ml Wasser wurde dann das Reaktionsprodukt durch Ätherextraktion isoliert (100 mg).

Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion :

Das zuvor erhaltene Produkt — 100 mg (0,32 mMol) deuteriertes 3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on — wurde in 50 ml abs. Äther gelöst und innerhalb von 20 Min. zu einer Suspension von 30 mg (0,8 mMol = 10 facher Überschuß) Lithiumaluminiumhydrid in 15 ml abs. Äther getropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt.

Aufarbeitung : Das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid wurde durch Zugabe von 10 ml Essigester zerstört. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und nach 15 Min. mit 50 ml Wasser versetzt, dem etwa 5 ml 10 proz. Schwefelsäure zugesetzt waren. Die beiden klaren Schichten wurden getrennt und die wäßrige Phase viermal mit Äther extrahiert. Die gesamte Ätherlösung wurde mit Wasser und Natriumhydrogenkarbonatlösung neutralgewaschen.
Rohausbeute : 95 mg

Das so erhaltene Produkt wurde in 80 ml Äthylalkohol gelöst und mit 50 ml 15 proz. Salzsäure 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde nach Zugabe von 100 ml Wasser das Reaktionsprodukt mit Äther extrahiert.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie.

Laufmittel : a) Äther/Chloroform 70 : 30
b) Äther mit 0,8% Äthylalkohol

Entwicklung : a) $R_F$-Wert 0,6 (blau)
7 mg 2,2,4,4,12,16,16-$d_7$-3ß,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (27)
Massenspektrum : $M^+$ 297, m/e 282, m/e 279, m/e 264, m/e 246, m/e 224, m/e 167

b) $R_F$-Wert 0,4 (blau)
30 mg 2,2,4,4,12,16,16-$d_7$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (21),
Schmp. 222-226°
Massenspektrum : $M^+$ 297 (100), m/e 279 (95), m/e 264 (52), m/e 246 (27), m/e 233 (25), m/e 218 (35), m/e 167 (100) ;
Deuterierungsgrad: 3,5% $d_0$ , 3,5% $d_1$, 3% $d_2$ 4% $d_3$, 3% $d_4$, 3% $d_5$, 18% $d_6$, 44% $d_7$, 18% $d_8$

2,2,4,4,16,16-$d_6$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22) [44]:

10 mg 21 wurden in 15 ml Eisessig unter Zugabe von 40 mg Platin(IV)-oxid 16 Stdn. bei Raumtemp. und Atmosphärendruck hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Essigsäure unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) am Rotationsverdampfer abdestilliert.
Das so erhaltene Produkt wurde mit Hilfe der Kombination Gaschro-

matograph/Massenspektrometer analysiert.

Ergebnis : 85% 2,2,4,4,16,16-$d_6$-3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan (22).

Die weitere Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Äther/Aceton . Schmp. 215-221°

Massenspektrum vgl. Abbild. 26

Deuterierungsgrad : 7% $d_4$, 8% $d_5$, 60% $d_6$, 20% $d_7$, 5% $d_8$

g) Deuterierung von 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) :

3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) :

Zu einer Suspension von 20 mg (0,53 mMol = 10facher Überschuß) $LiAlH_4$ in 10 ml abs. Tetrahydrofuran wurde eine Lösung von 60 mg (0,2 mMol) 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan-11-on (11) in 40 ml abs. Tetrahydrofuran zugetropft.
Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 2 Stdn. unter Rühren am Rückfluß erhitzt. Zur Zerstörung des überschüssigen Lithiumaluminiumhydrids wurden 10 ml Äthylacetat zugefügt. Durch Zugabe einiger ml verdünnter Salzsäure und Äthylalkohol wurde eine klare Lösung erhalten die dann zur Trockene eingeengt wurde.

Der feste Rückstand wurde in 40 ml Äthanol aufgenommen und unter Zugabe von 30 ml 15 proz. Salzsäure 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit Wasser wurde das Reaktionsprodukt mit Äther extrahiert. Die vereinigte Ätherphase wurde mit einer Natriumkarbonatlösung neutralgewaschen.

Rohausbeute : 50 mg (87% d. Th.)

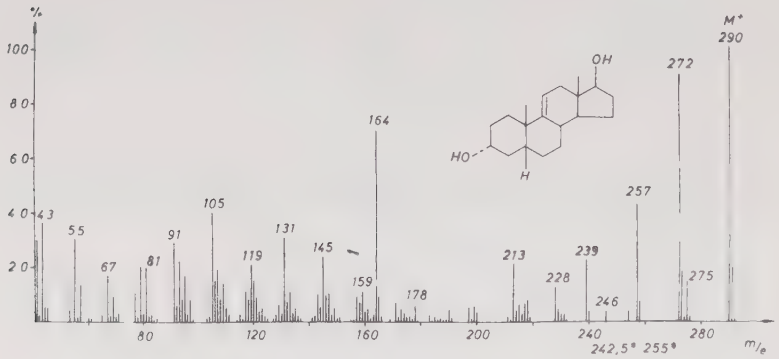
Nach dünnschichtchromatographischer Reinigung wurden 25 mg (44% d. Th.) 3$\alpha$,17ß-Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23) erhalten.

$R_F$-Wert 0,35

Laufmittelsystem : a) Äther, b) Äther, 0,5% Äthylalkohol ;

Schmp. 225-228°

Massenspektrum :




Deuterierung mit Deuteriumgas : [47]

1,5 mg 23 wurden in 4 ml Monodeuteroessigsäure gelöst und mit 20 mg Platin(IV)-oxud 7 Tage mit Deuteriumgas bei Atmosphärendruck deuteriert.

Die Reaktion wurde am zweiten, vierten und sechsten Tag kurz unterbrochen, der Katalysator abfiltriert und die Deuterierung mit jeweils 20 mg frischen $PtO_2$-Katalysator fortgesetzt.

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Hilfe der Kombination Gaschromatograph/Massenspektrometer untersucht.

Ergebnis : 16% 9α,11,X -$d_3$-3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan,
80% unumgesetztes 3α,17ß. Dihydroxy-5ß-androst-9(11)-en (23).

Massenspektrum siehe Abbild. 23

Literaturverzeichnis


1) a) W. H. McFadden, M. Lounsbury und A. Wahrhaftig, Can. J. Chem. Chem., 36, 990 (1958).

b) W. H. McFadden, D. R. Black und J. W. Corse, J. Phys. Chem. 67, 1517 (1963)

c) S-Meyerson und L. C. Leitch, J. Amer. Chem. Soc., 86, 2555 (1964).

d) W. Benz und K. Biemann, J. Amer. Chem. Soc. 86, 2375 (1964).

2) P. Natalis, Bull. Soc. Chim Belges, 69 224 (1960)

3) C. G. McDonald, J. S. Shannon und G. Sugowdz ,Tetrahedron Lett. 1963, 807.

4) H. Budzikiewicz, Z. Pelah und C. Djerassi, Monh. Chem., 95, 158 (1964).

5) K.Biemann, J. Seibl, J. Amer. Chem. Soc., 81, 3149 (1959).

6) V. I. Zaretskii, N. S. Wulfson, V. G. Zaikin, L. M. Kogan, N. E. Voishvillo und I. V. Torgov , Tetrahedron, 22, 1399 (1966).

7. H. Egger und G. Spiteller Monh. Chem. 97, 579 (1966).

8) M. Ende, Diplomarbeit, Universität Göttingen 1971.

9) M. Ende und G. Spiteller , Monh. Chem., 102, 929 (1971) .

10) M. Ende und G. Spiteller, Tetrahedron , 29, 2457 (1973).

11) H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Tetrahedron, 27, 1093, 1101, 1737 (1971).

12) G. Spiteller und Mitarb. ,Steroidmassenspektrenkartei

13) A. R. Ubbelohde und K. J. Gallagher, Acta Crystallogr., 8, 71 (1955).

14) C. C. Fenselau und C. H. Robinson, J. Amer. Chem. Soc., 93 , 3070 (1971).

15) J. Cable, J. K. MacLeod, M. R. Vegar und R. J. Wells, Org. Mass. Spectrom., 7, 1137 (1973).

16) J. Winkler und H. -F. Grützmacher, Org. Mass. Spektrom., 3 1139 (1970).

17) N. S. Vul'fson, V. I. Zaretskii und V. G. Zaikin, Russ, Chem. Rev. 41, 46 (1972).

18) C. G. McDonald, J. S. Shannon und G. Sugowdz, Tetrahedron Lett., 1963, 807.

19) H. Budzikiewicz, Z. Pelah und C. Djerassi, Monh. Chem. 95, 158 (1964).

20) R. S. Ward und D. H. Williams, Org. Chem. 34, 3373 (1969).

21) H. -F. Grützmacher und K. H. Fechner, Tetrahedron Lett., 1971, 2217.

22) J. Karliner, H. Buszikiewicz und C. Djerassi, Org. Chem., 31, 710 (1966).

23) H. W Fehlhaber, O. Lenoir und P. Welzel, Vorabdruck eines Vortrages, der im Sommer 1970 auf der internationalen Massenspektrometrietagung in Brüssel gehalten wurde.

24) H. Egger und G. Spiteller, Monh. Chem. 97, 579 (1966).

25) R. Robbiani und J. Seibl, Org. Mass Spectrom., 7, 1153 (1973)

26) F. J. Hammerschmidt und G. Spiteller, Tetrahedron, 29, 2465 (1973).

27) J. Jovanovic und G. Spiteller, Tetrahedron, 29 4017 (1973).

28) W. Hölzel, Dissertation, Universität Göttingen 1971

29) M. F. Grostic und K. L. Rinehart, Org. Chem. 33, 1740 (1968).

30) E. Zietz und G. Spiteller, Tetrahedron 30, 585 (1974).

31) H. Klein und C. Djerassi, Chem. Ber. 106, 1897 (1973).

32) J. Fried und J. A. Edwards: "Organic Reactions in Steroid Chemistry", Van Nostrand Reinhold Comp,, N.Y. 1972, Bd. 1.

33) H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams : "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Holden - Day,. San Francisco, London, Amsterdam, 1964, Bd. 1.

34) H. Budzikiewicz : "Massenspektrometrie", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1972

35) C. J. W. Brooks und J. K. Norymberski, Biochem. J. 55, 371 (1953).

36) H. Vorbrueggen, Steroids 1, 45 (1963)

37) C. Djerassi : "Steroid Reactions", Holden-Day, Inc., San Francisco, 1963.

38) E. Elisberg, H. Vanderhaege und T. F. Gallagher, J. Amer. Chem. Soc. 74, 2814 (1952).

39) A. Hajos und O. Fuchs, Acta Chim Sci, Hung. 21, 137 (1959).

40) J. Seibl und T. Gäumann, Helv. Chim. Acta 46, 2857 (1963).

41) D. H. Williams, J. M. Wilson, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2091 (1963).

42) a) A. Osborn, F. H. Jardine, J. F. Young und G. Wilkinson, J. Chem. Soc., A 1966, 1711.

b) W. Voelter und C. Djerassi, Chem. Ber. 101, 58 (1968).

43) D. K. Fukushima und T. F. Gallagher, J. Amer. Chem. Soc. 77, 139 (1955).

44) H. L. Herzog, M. A. Jevnik, P. L. Perlman, A. Nobile und E. B. Hershberg, J. Amer. Chem. Soc. 75, 266 (1953).

45) T. F. Gallagher, J. Amer. Chem. Soc. 74, 2814 (1952)

46) W. G. Dauben, E. J. Blanz. J. Jin und R. A. Micheli, J. Amer. Chem. Soc. 78 3752 (1956).

47) D. K. Fukushima und T. F. Gallagher, J. Amer. Chem. Soc. 77, 139 (1955).

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von Oktober 1971 bis April 1974 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Spiteller durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. G. Spiteller, danke ich für die Aufgabenstellung und seine stete Bereitschaft, die mit dieser Arbeit verbundenen Probleme zu diskutieren.

Lebenslauf

Am 27. Juni 1947 wurde ich als Sohn des Landwirts Richard Ende und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Breiler, in Hovestadt, Kreis Soest, geboren.

Ich besuchte acht Jahre die Volksschule, von 1953 bis 1960 in Langwedel, Kreis Gifhorn und im letzten Jahr in Eschershausen, Kreis Holzminden.

Von 1961 bis 1964 lernte ich zunächst zwei Jahre bei der Firma Dasag, Deutsche Naturasphalt AG., Eschershausen und anschließend eineinhalb Jahre bei der Firma Dragoco, Holzminden, Chemielaborant. Die Lehrabschlußprüfung legte ich im September 1964 ab. Ich wurde anschließend von der Firma Dragoco als Chemielaborant übernommen.

Zur Erlangung der Fachschulreife besuchte ich von April 1965 bis 1966 die Berufsaufbauschule Holzminden und legte die Fachschulreifeprüfung im März 1966 ab. Von 1966 bis 1969 war ich sechs Semester Schüler der Staatlichen Ingenieurschule für Maschinenwesen Essen, Abteilung Chemie. Im Januar 1969 wurde mir nach bestandenem Ingenieurexamen die fachgebundene Hochschulreife zuerkannt.

Im Sommersemester 1969 begann ich mit dem Hochschulstudium an der Technischen Universität Clausthal, wo ich im Oktober 1969 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung erfolgreich ablegte. Im Mai 1970 wechselte ich an die Universität Göttingen, um bei Herrn Professor Dr. G. Spiteller die Diplomarbeit mit dem Titel : "Systematische Untersuchung der Massenspektren von Pregnanderivaten mit Sauerstoffsubstituenten in den Positionen 3, 11 und 20" anzufertigen.

Am 16. Juni 1971 bestand ich das Diplom-Hauptexamen für Che-

miker.

Seitdem arbeite ich ebenfalls unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Spiteller an der vorliegenden Dissertation. Während dieser Zeit bin ich von der Studienstiftung des Deutschen Volkes durch ein Doktorandenstipendium gefördert worden.